

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**HEMODIÁLISE ALTERA PARÂMETROS LIPÍDICOS, ATIVIDADE DA
PARAOXONASE E INCORPORAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFOLIPÍDIOS**

FRANCIANE SANTOS MARQUES

Salvador – Bahia

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M357h Marques, Franciane Santos
Hemodiálise altera parâmetros lipídicos, atividade da paraoxonase e
incorporação *in vitro* de fosfolipídios [manuscrito] / Franciane Santos
Marques. - 2014.
82 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).
Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina.
Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.
Orientador: Prof Dr. Ricardo David Couto, Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

1. Hemodiálise. 2. Dislipidemia. 3. Fosfolipídios. 4. Doença renal. I.Título.

CDU 616.61-008.6

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

TESE DE DOUTORADO

HEMODIÁLISE ALTERA PARÂMETROS LIPÍDICOS, ATIVIDADE DA
PARAOXONASE E INCORPORAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFOLÍPIDIOS

FRANCIANE SANTOS MARQUES

Orientador: Prof. Dr. Ricardo David Couto

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Bahia

2014

HEMODIÁLISE ALTERA PARÂMETROS LIPÍDICOS, ATIVIDADE DA PARAOXONASE E
INCORPORAÇÃO *IN VITRO* DE FOSFOLIPÍDIOS

FRANCIANE SANTOS MARQUES

Folha de Aprovação

Comissão Examinadora

*Dedico este trabalho a minha avó Ivone Andrade
e mãe Maria de Fátima Marques pela
perseverança e força para que eu pudesse chegar ao
fim desta hercúlea e linda caminhada!*

Franciane Marques

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meus caminhos e ter me dado a oportunidade de cursar Doutorado.

Aos pacientes que apesar de todo sofrimento físico aceitaram participar deste estudo e mesmo estando acoplados a uma máquina, nos seus olhos brilhavam a ESPERANÇA.

A minha avó e mãe que foram minha fonte de força e fé para trilhar esta caminhada.

A tia Meire que sempre me estimulou e se manteve na torcida pelo meu sucesso.

Ao meu orientador Ricardo David Couto pela paciência e aprendizado constante.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa – FIOCRUZ.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Ana Neri, em especial, a Roberta Almeida pelo apoio.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFBA.

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia - LETI – FIOCRUZ.

Ao Laboratório de Metabolismo de Lípidos (INCOR - São Paulo), em especial ao Professor Dr. Raul Maranhão e a Dra. Débora Deus.

Aos amigos, em especial, Renato Oliveira, Danylo Silva e Sara Rocha pelos momentos compartilhados.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À FIOCRUZ pelo auxílio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

MARQUES, Franciane Santos. Hemodiálise altera parâmetros lipídicos, atividade da paraoxonase e incorporação *in vitro* de fosfolipídios. 82 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) está associada com aterosclerose precoce, que é agravada por distúrbio do metabolismo das lipoproteínas, bem como outras alterações que contribuem para disfunção endotelial e de outras túnicas vasculares levando a morte prematura. O perfil lipídico na DRC evidencia a presença de hipertrigliceridemia, redução do colesterol da HDL (HDL-C) e alteração dos padrões de enzimas que atuam em vias regulatórias do metabolismo da HDL, dentre elas, paraoxonase 1 (PON-1) e proteína de transferência de fosfolípide (PLTP). Além disso, a existência de outros fatores de risco para DRC como *stress* oxidativo e inflamação agravam o quadro dislipidêmico. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da hemodiálise (HD) no remodelamento das partículas de HDL através da incorporação *in vitro* de fosfolipídios entre as lipoproteínas, da capacidade antioxidante da HDL (PON-1) e das razões de risco cardiovascular no pré e pós-hemodiálise. Todos os subgrupos mostraram elevação de colesterol (CT), HDL-C e não-HDL-C após HD, porém não foi observada modificação na concentração de triglicérides (TG) em pré- e pós-HD. Com relação ao balanço do transporte de colesterol observou-se que a apo AI aumentou no pós-HD, subgrupos 30-39 e 40-49 ($p < 0,05$) e 50-59 anos ($p < 0,01$). O mesmo comportamento também foi notado para apo B, ou seja, elevação nos subgrupos 40-49 ($p < 0,01$), 50-59 ($p < 0,001$) e > 60 anos ($p < 0,05$). O índice CT/HDL-C reduziu nos subgrupos 30-39 ($p < 0,01$), 40-49 ($p < 0,01$) e > 60 anos ($p < 0,01$) no pós-HD, a razão TG/HDL-C diminuiu nos subgrupos 30-39 ($p < 0,05$) e 40-49 anos ($p < 0,05$) após HD. Alguns autores têm apontado influência da composição do tampão dialisato na elevação sérica do HDL-C. Com relação ao subtipo da LDL, o índice LDL-C/apoB aumentou no subgrupo > 60 anos, $p < 0,05$ após HD, no entanto não houve modificação no subtipo da LDL. O índice HDL-C/apo AI aumentou nos subgrupos 40-49 ($p < 0,05$) e > 60 anos ($p < 0,01$). Estes achados resultam em maior carga de colesterol na HDL, o que pode sugerir aumento no tamanho desta partícula após a HD. A razão não-HDL-C/HDL-C reduziu nos subgrupos 40-49 ($p < 0,05$) e > 60 anos ($p < 0,05$). A correlação entre % de incorporação de PL – ^{14}C e não HDL-C/HDL-C foi negativa no subgrupo 30-39 anos tanto no pré-HD ($r = -0,90$; $p = 0,002$), quanto no pós-HD ($r = -0,78$; $p = 0,022$), Pearson. Observou-se correlação positiva entre PON-1 e % de incorporação de PL – ^{14}C no subgrupo > 60 anos tanto no pré-HD ($r = 0,63$; $p = 0,029$), quanto no pós-HD ($r = 0,65$; $p = 0,022$), Pearson. A atividade da PON-1 aumentou apenas no subgrupo 50-59 anos no pré-HD (59 ± 30 ; $p < 0,05$) e no pós-HD (73 ± 38 ; $p < 0,05$), demonstrando que a HD pode interferir no potencial antioxidante da HDL. Há diversos relatos do potencial pró-aterogênico da PLTP. No presente estudo, foi observada redução significativa da % de incorporação de PL – ^{14}C ($p < 0,05$) no pós-HD em comparação ao pré-HD do grupo > 60 anos, o que traduz a diminuição da atividade desta enzima após a HD. Em conclusão, os achados deste trabalho demonstram que durante a HD há alteração do perfil lipídico e das razões de riscos cardíacos, e que nesta casuística a HD alterou o remodelamento da HDL. Estes resultados evidenciam a influência da HD no metabolismo lipídico.

Palavras-chave: Hemodiálise, Dislipidemia, Bioíndices, PLTP e PON-1.

MARQUES, Franciane Santos. Hemodialysis alters lipid parameters, paraoxonase activity and *in vitro* incorporation of phospholipids. 82 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is associated with premature atherosclerosis, which is aggravated by lipoprotein metabolism disorders, endothelium dysfunction and premature death. The aim of this study was to evaluate the effect of hemodialysis (HD) on HDL remodeling by *in vitro* incorporation of phospholipids, HDL (PON-1) antioxidant capacity and cardiovascular risk ratios in pre- and post-HD. All age groups (30-39; 40-49; 50-59 and > 60 years) showed increase of cholesterol (TC), HDL-C and non-HDL-C in post-HD, but no changes was observed in triglycerides (TG) concentration. Regards to cholesterol transport, apo AI increased in 30-39 and 40-49 ($p < 0.05$) and 50-59 ($p < 0.01$) after HD. Apo B shows similar findings, since it was elevated in 40-49 ($p < 0.01$), 50-59 ($p < 0.001$) and > 60 ($p < 0.05$). The TC/HDL-C ratio decreased in 30-39 ($p < 0.01$), 40-49 ($p < 0.01$) and >60 ($p < 0.01$) after HD. The TG/ HDL-C ratio decreased in 30-39 ($p < 0.05$) and 40-49 ($p < 0.05$) in post-HD. Some authors have shown the influence of dialysate buffer composition on serum HDL-C increase. Regarding the subtype of LDL, the LDL-C/apoB index increased in > 60 ($p < 0.05$) after HD, however no change was observed in LDL subtype. The HDL-C/apo AI index increased in 40-49 ($p < 0.05$) and >60 ($p < 0.01$). These finds suggests increased cholesterol content on HDL, with bigger particle size diameter in post-HD. The non-HDL-C/HDL-C ratio reduced in 40-49 ($p < 0.05$) and >60 ($p < 0.05$). The correlation between % incorporation of PL – ^{14}C and non-HDL-C/HDL-C was negative in 30-39, both in pre-HD ($r = -0.90$; $p = 0.002$) and post-HD ($r = -0.78$; $p = 0.022$), Pearson. The correlation between PON-1 and % incorporation of PL – ^{14}C was positive in >60, both in pre-HD ($r = 0.63$; $p = 0.029$) and post-HD ($r = 0.65$; $p = 0.022$), Pearson. The activity of PON-1 increased only in 50-59 in pre-HD (59 ± 30 ; $p < 0.05$) and in post-HD (73 ± 38 ; $p < 0.05$), indicating that HD may interfere within HDL antioxidant capacity. There are several reports showing the PLTP pro-atherogenicity. In the present study, was observed a significant reduction in % incorporation of PL – ^{14}C ($p < 0.05$) in post-HD when compared to pre-HD in >60, showing PON-1 decreased activity after HD. Concluding, the study demonstrates significant changes of lipid profile, enzymatic activity and cardiac risk ratios during HD, and in this casuistic the HD altered the HDL remodeling. These results demonstrate the influence of HD on lipid metabolism.

Key-words: Hemodialysis, Dyslipidemia, Bioindices, PLTP and PON-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fatores de risco cardiovascular (tradicional e não tradicional) envolvidos na aterogênese e lesão renal	14
Figura 2	Diagrama simplificado da alteração do perfil lipídico durante a progressão da doença renal crônica	16
Figura 3	Via metabólica da VLDL	20
Figura 4	Representação da LDL pequena e densa penetrando na camada íntima, dando início à patogênese da aterosclerose	22
Figura 5	Estrutura da HDL	23
Figura 6	Representação esquemática do transporte reverso do colesterol	25
Figura 7	Ilustração da constituição lipídica dos índices de risco cardiovascular (CT/HDL-C; LDL-C/HDL-C; não-HDL-C/HDL-C; apo B/apo AI e não-HDL-C)	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Definição e classificação da DRC pela KDIGO	13
Tabela 2.	Evidências da anti-aterogenicidade da PON-1 em humanos	17
Tabela 3	Classificação dos participantes do estudo estratificados por faixa etária conforme critérios da V diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose (2013).	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA-1	<i>Binding cassette transporter A1</i>
ACAT	Acil-CoA: colesterol aciltransferase
apo	Apolipoproteína
CE	Colesterol esterificado (<i>cholesteryl Ester</i>)
CETP	- Proteína de transferência de ésteres de colesterol (<i>cholesteryl ester transfer protein</i>)
CT	Colesterol total
LBP	Proteína de ligação a lipopolissacarídeos
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
DP	Diálise peritoneal
DR	Doença renal
CKD	Doença renal crônica (<i>Chronic kidney disease</i>)
DRC	Doença renal crônica
DREF	Doença renal em estágio final
FC	Colesterol livre (<i>free cholesterol</i>)
HD	Hemodiálise
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA redutase	enzima hidroxil-3-metil-glutaril-CoA redutase
HNF	Heparina não fracionada
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IAP	Índice aterogênico do plasma
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL-6	Interleucina – 6
IMC	Índice de massa corpórea
KDIGO	Doença renal: melhorar o desfecho global (<i>Kidney Disease: Improving Global Outcome</i>)
L55M	Substituição de uma Leucina por uma Metionina no códon 55
LBP	Proteína de ligação a lipopolissacarídeos
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase (<i>lecithin: cholesterol</i>

	<i>Acyltransferase)</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LDLox	LDL oxidada
LDLr	Receptor de LDL
LOX-1	Receptor-1 oxidado de LDL semelhante à lecitina (<i>lectin-like oxidized LDL receptor-1</i>)
LPL	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeos
LRP	Proteína relacionada ao receptor de LDL (<i>receptor-related protein</i>)
MPO	Mieloperoxidase
PAF-AH	Fator ativador de plaquetas
PD	Diálise Peritoneal (<i>Peritoneal dialysis</i>)
PL	Fosfolípide (<i>phospholipid</i>)
PL – ¹⁴C	Fosfolípide ligado ao carbono 14
PLD	Fosfolipase D (<i>phospholipase D</i>)
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípide (<i>phospholipid transfer protein</i>)
PON-1	Paraoxonase 1
Q192R	Substituição de um ácido glutâmico por uma arginina no códon 192
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SR-AI	Receptor <i>scavenger</i> classe – AI (<i>scavenger receptor class AI</i>)
TFG	Taxa de filtração glomerular
TG	Triglicérides
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRS	Terapia renal substitutiva
TX	Transplante renal (<i>kidney transplant</i>)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-C	Colesterol da lipoproteína de densidade muito baixa
VLDLr	Receptor de VLDL

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) E DOENÇA RENAL EM ESTÁGIO FINAL (DREF)	12
1.2	A ELEVAÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR NA DOENÇA RENAL CRÔNICA	13
1.3	DISLIPIDEMIA E TERAPIA DE SUBSTITUIÇÃO RENAL	15
1.4	PARAOXONASE 1 E DOENÇA RENAL CRÔNICA	16
1.5	DISLIPIDEMIA URÊMICA	18
1.5.1	Triglicérides e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL)	19
1.5.2	Colesterol e Lipoproteína de baixa densidade (LDL)	20
1.5.3	Lipoproteína de alta densidade (HDL)	22
1.5.3.1	Proteína de transferência de fosfolípide (PLTP)	26
1.6	BIOÍNDICES	28
2.	JUSTIFICATIVA	32
3.	OBJETIVOS	34
4.	METODOLOGIA	34
4.1	DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA	34
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	34
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	35
4.4	DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS	35
4.5	INCORPORAÇÃO DE FOSFOLÍPIDES NA HDL	35
4.6	ATIVIDADE DA PARAOXONASE	36
4.7	BIOINDICES	36
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5.	RESULTADOS	38
6.	DISCUSSÃO	60
7.	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	APÊNDICES	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) E DOENÇA RENAL EM ESTÁGIO FINAL (DREF)

Dados mundiais sobre a epidemiologia da DRC são bastante escassos, a maioria das informações encontradas na literatura reportam pacientes que estão em terapia renal substitutiva (TRS). No Brasil a situação é bastante similar, de acordo com o censo anual (2011) realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, estima-se que 91.314 pacientes se encontravam, naquele ano, em tratamento dialítico crônico. Essas informações tem possibilitado o melhor conhecimento para ser utilizado tanto em planejamento assistencial como no uso mais racional dos recursos econômicos direcionados a tais programas terapêuticos, pois, o progressivo envelhecimento da população brasileira e os níveis elevados de prevalência da hipertensão arterial e do diabetes (duas das principais etiologias da DRC) propiciam um crescimento alarmante desta pandemia (SESSO *et al.*, 2012).

A DRC pode ser definida pela presença de lesão renal e redução da taxa de filtração glomerular (TFG) $< 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ em período maior ou igual a três meses. Independentemente da causa a DRC pode ser classificada em 05 estágios pela redução da TFG e presença de albuminúria, conforme o guia de prática clínica publicado em 2013 pela *Disease kidney: Improving Global Outcome* (KDIGO), este órgão é uma fundação internacional, sem fins lucrativos, que preconiza a melhoria do atendimento e cuidado com os pacientes renais crônicos (SARNAK, 2003; LEVEY *et al.*, 2010; BOWLING & MUNTNER, 2012). De acordo com a Tabela 1.

Nas últimas décadas tem ocorrido crescente reconhecimento das limitações na definição e classificação das doenças renais, o que tem provocado discussões e debates científicos, principalmente na nefrologia, mostrando cada vez mais a importância da estratificação dos diferentes estágios da doença renal (LEVEY *et al.*, 2010). Assim, as diferentes etiologias e os estágios da doença renal que são denominados usualmente por DRC, foram subclassificados para facilitar o trabalho na coleta de dados e interpretação nos estudos clínicos e epidemiológicos; além de indicar a gravidade da doença renal e o risco de desenvolvimento da doença cardiovascular (DCV). Desta forma, o objetivo final da subclassificação é auxiliar o desenvolvimento de condutas e protocolos terapêuticos que

melhor atendam as necessidades específicas dos pacientes portadores de doença renal crônica (SHOJI *et al.*, 2011).

Tabela 1. Definição e classificação da DRC pela KDIGO.

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1,73m ²)	Termos relacionados	Classificação conforme tratamento
1	Lesão renal com TFG normal ou aumentada	≥ 90	Albuminúria, proteinúria e hematuria	
2	Lesão renal com discreta redução da TFG	60-89	Albuminúria, proteinúria e hematuria	“T” se transplantado renal
3	Moderada redução da TFG	30-59	DRC ou DR leve	
4	Severa redução da TFG	15-29	DRC, DR severa ou DREF	
5	Falência renal	< 15 (ou diálise)	Falência renal, uremia e DREF	“D” se diálise

Fonte: traduzida de SHOJI *et al.* (2011).

1.2. A ELEVAÇÃO DO RISCO CARDIOVASCULAR NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A DCV é a principal causa de morbidade e mortalidade dos pacientes portadores de doença renal crônica. Apesar de alguns pacientes com DRC desenvolverem a DREF, a maioria deles morrem de DCV antes mesmo de chegar ao estágio final da doença renal (TSIMIHODIMOS *et al.*, 2011; CHU *et al.*, 2012; GUGLIUCCI *et al.*, 2012). A dislipidemia, tabagismo, diabetes mellitus, obesidade, hipertensão, idade avançada e sexo masculino são fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de DCV, figura 01. Ainda permanece controverso como a DRC aumenta o risco de desenvolvimento de DCV, ainda assim, o risco individual do doente renal crônico é bastante heterogêneo, sendo dependente do grau da disfunção renal e etiologia da doença (YAMAMOTO e KON, 2009). Ainda neste aspecto, para a população geral tem sido documentado que a hipercolesterolemia, aumento da pressão arterial e do índice de massa corpórea (IMC) não estão associados, de forma consistente, com morte por evento cardíaco agudo (TZOTZAS *et al.*, 2011). Entretanto, alguns biomarcadores

para elevação do risco cardiovascular têm sido sugeridos na DRC, dentre eles, indicadores de desnutrição, hipoalbuminemia, anemia, elevação do fibrinogênio, *stress* oxidativo e a inflamação, figura 01. Nos últimos anos, o *stress* oxidativo e a inflamação têm obtido atenção especial no desenvolvimento de DCV secundária a DRC (YAO *et al.*, 2004; CHADE *et al.*, 2005; YAMAMOTO e KON, 2009). Parekh *et al.* (2008), demonstraram em estudo de corte prospectivo que pacientes em diálise com elevados níveis de proteína C reativa e interleucina - 6 (IL-6) tinham maior risco de morte súbita (cardíaca) do que aqueles com menor concentração sérica destes marcadores.

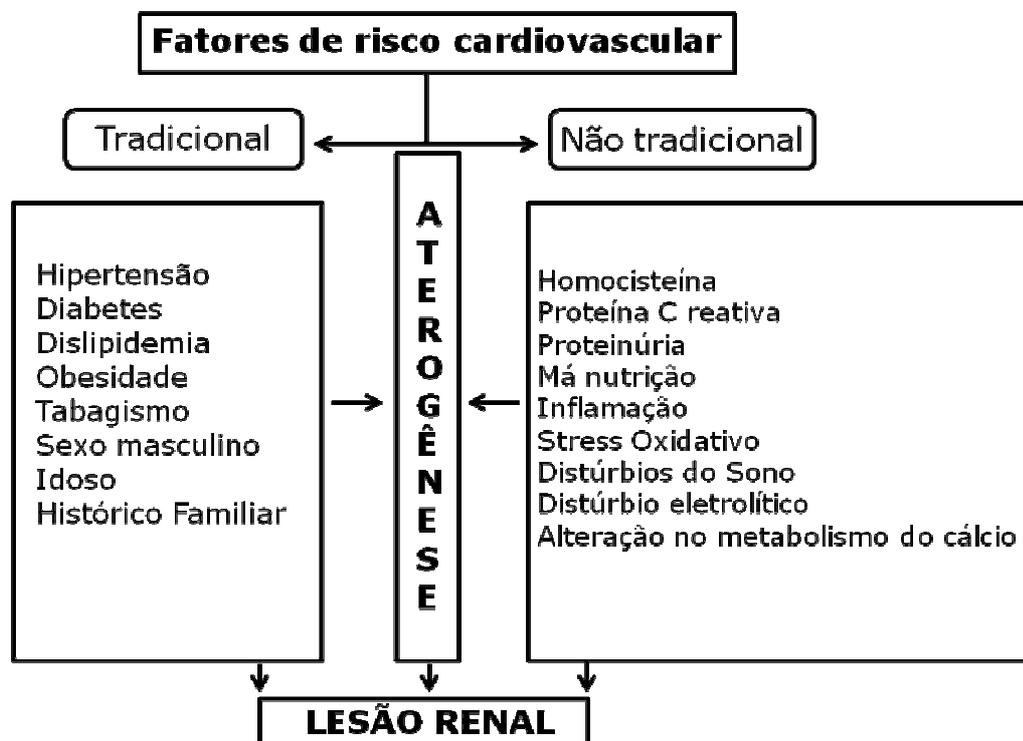


Figura 1. Fatores de risco cardiovascular (tradicional e não tradicional) envolvidos na aterogênese e lesão renal.

Fonte: Traduzida de Chade *et al.* (2005).

A progressiva redução da função renal pode levar o acúmulo de toxinas urêmicas, as quais podem agravar o *stress* oxidativo e a inflamação, contribuindo assim com a consequente disfunção endotelial e aterosclerose. O mecanismo de *stress* oxidativo na uremia pode envolver a ativação de NADPH oxidase, espécies reativas de oxigênio (ROS) e mieloperoxidase (MPO). Existem evidências substanciais de que os oxidantes produzidos pela ação da MPO possuem papel chave na modificação das partículas de LDL (aumento da taxa de oxidação) e de HDL (alteração funcional) com consequente formação da placa de atheroma em humanos. A MPO é sintetizada por neutrófilos, monócitos/macrófagos e a sua liberação

pelos leucócitos durante a sessão de hemodiálise parece dar início à lesão endotelial em indivíduos com DREF (SCHIFFRIN *et al.*, 2007; COHEN TERVAERT, 2013).

1.3. DISLIPIDEMIA E TERAPIA DE SUBSTITUIÇÃO RENAL

A Dislipidemia urêmica é uma complicação comum em pacientes com DRC, que pode persistir ou piorar durante a terapia de substituição renal (MITWALLI *et al.*, 2011). Entretanto, a técnica dialítica utilizada na terapia, costuma resultar em diferentes perfis dislipidêmicos. Pacientes em diálise peritoneal (DP) frequentemente exibem aumento sérico do colesterol total (CT) e colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) (CHMIELEWSKI *et al.*, 2008), figura 03. Assim como alguns estudos demonstram maior prevalência de hipertrigliceridemia em pacientes em DP quando comparados com aqueles em hemodiálise (HD), conforme figura 03. Apesar do mecanismo fisiopatológico ainda ser desconhecido, foi sugerido que a absorção de glicose no fluido dialítico pode aumentar a secreção de insulina com conseqüente síntese e secreção hepática de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Estudos recentes indicam que a redução de glicose no fluido dialítico através do uso da solução dialítica a base de icodextrina melhora o perfil lipídico dos pacientes renais crônicos em DP (LACQUANITI *et al.*, 2010; TSIMIHODIMOS *et al.*, 2011).

Entretanto, pacientes em HD podem ter o metabolismo das lipoproteínas potencialmente alterado, devido ao uso repetido de heparina nas sessões de hemodiálise. A liberação de heparina não fracionada (HNF) na circulação extracorpórea, ativa a lipase lipoproteica (LPL) que tem como função a hidrólise de moléculas de triglicérides encontradas nas partículas de colesterol, resultando na redução da concentração sérica dos TG. Por outro lado, tem sido proposto que repetidas exposições a HNF reduzem os estoques de LPL tecidual, situação que pode exacerbar a hipertrigliceridemia de pacientes em hemodiálise (ATTMAN *et al.*, 2003; NASSTROM *et al.*, 2005).

Alguns estudos têm demonstrado que o tipo do material da membrana dialítica pode interferir no metabolismo lipídico. O uso de técnicas de HD de alto fluxo com membranas de polissulfona ou triacetato de celulose foi acompanhado de significativa redução nos níveis séricos de triglicérides, isto pode ser atribuído, em parte, ao aumento da relação apo CII/CIII, que provoca o aumento de atividade da LPL e facilita a lipólise intravascular de lipoproteínas ricas em triglicérides (TSIMIHODIMOS *et al.*, 2011; VARIZI, 2009).

Assim, existem poucos estudos que realizam comparação entre a dislipidemia na DP e HD, entretanto os caminhos que levam a disfunção lipídica parecem ser distintos entre os tipos de TRS.

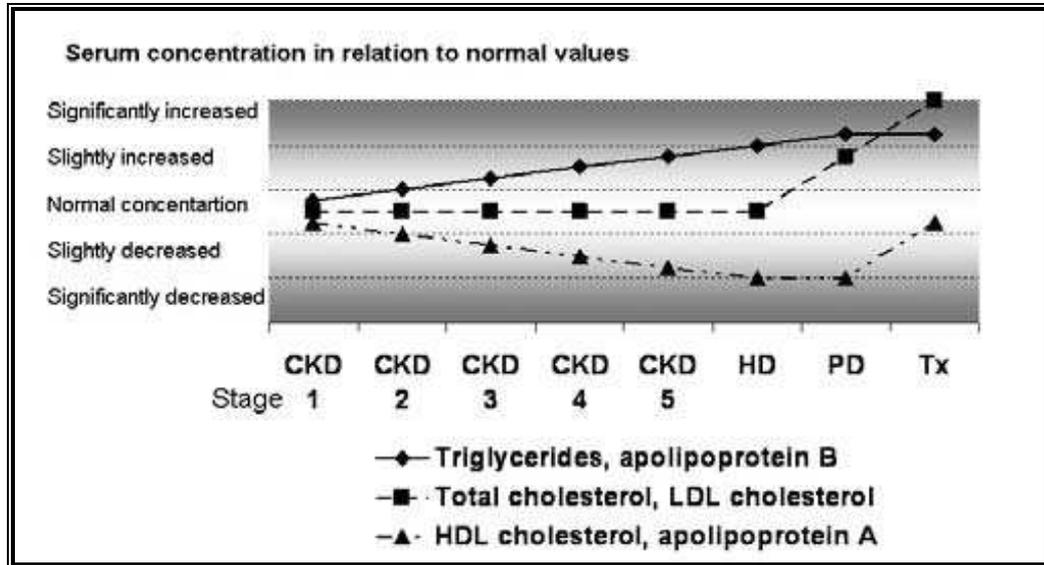


Figura 2. Diagrama simplificado da alteração do perfil lipídico durante a progressão da doença renal crônica.

CKD – doença renal crônica, HD – hemodiálise, HDL - lipoproteína de alta densidade, LDL - lipoproteína de baixa densidade, PD - diálise peritoneal, TX - transplantes renal. Fonte: Chmielewski *et al.* (2008).

1.4. PARAOXONASE 1 E DOENÇA RENAL CRÔNICA

Inicialmente caracterizada por ser a principal responsável pela detoxicação de agentes organofosforados no organismo humano, a paraoxonase - 1 (PON-1) é uma enzima (aril esterase dependente de cálcio) sintetizada pelo fígado e secretada na corrente sanguínea, onde se associa a subfrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) contendo clusterina (apolipoproteína J) e apolipoproteína AI (apo AI), por ter natureza versátil, possui atividade paraoxonase e aril-esterase quando hidroliza compostos organofosforados (paroxon) e éster de ácido carboxílico (fenilacetato) respectivamente, além disso, algumas evidências sustentam que a PON-1 possua atividade lactonase quando atua sobre fosfolípidios oxidados e na homocisteína tiolactona (CORREIA e PERRY, 2010; KOTANI *et al.*, 2011; GUGLIUCCI *et al.*, 2012).

Dois polimorfismos gênicos em regiões codificadoras são os responsáveis, parcialmente, por controlar a expressão da PON-1: a substituição de uma Leucina por uma Metionina no códon 55 (L55M) e a substituição de um ácido glutâmico por uma arginina no códon 192 (Q192R). O polimorfismo L55M afeta a concentração da enzima enquanto o polimorfismo Q192R influencia na atividade catalítica, assim, tais variações moleculares

geram tanto defeito quantitativo como qualitativo. As aloenzimas PON-1_{192Q} e a PON-1_{192R} podem atuar sobre os distintos substratos gerados durante o processo de oxidação da LDL e talvez tenham diferentes sensibilidades na ação contra peróxidos lipídicos, estas diferenças possivelmente contribuem para as divergências do provável papel antiaterosclerótico da PON-1 (DRAGANOV e LA DU, 2004; JAMES e DEAKIN, 2004; NG *et al.*, 2005; PRAKASH *et al.*, 2010; CAMPS *et al.*, 2012). Um resumo dos possíveis mecanismos pelos quais a PON-1 protege contra as doenças cardiovasculares se encontra na Tabela 2.

Tabela 2. Evidências da anti-aterogenicidade da PON-1 em humanos.

-
1. Protege a HDL contra oxidação e preserva suas funções
 ↑o efluxo de colesterol celular proveniente dos macrófagos
 2. Protege a LDL contra oxidação
 ↓peróxidos lipídicos
 3. Melhora os efeitos da LDL oxidada
 ↓inflamação e citotoxicidade de fosfolípidios oxidados
 ↓captação de LDL pelos macrófagos
 ↓transmigração de monócitos induzida pela LDL oxidada
 4. Reduz os peróxidos lipídicos na lesão aterosclerótica
-

Fonte: traduzida de DRAGANOV & Du (2004).

As concentrações e atividades da PON-1 sofrem tanto influências genótípicas como fenotípicas (dieta, estilo de vida, fatores ambientais e tipo de doença) (DRAGANOV e LA DU, 2004; RAJKOVIC *et al.*, 2010; CAMPS *et al.*, 2012). Independentemente do genótipo a redução da atividade da PON-1 tem sido associada a diversas manifestações patogênicas que envolvem *stress* oxidativo como a hiperlipidemia, diabetes tipo 1, doença arterial coronariana (DAC), síndrome metabólica, uremia e DRC (NG *et al.*, 2005). Diversos estudos tem associado à redução dos níveis séricos da PON-1 ao aumento do risco de desenvolvimento de DAC e severidade desta doença (MOHAMED *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2012), porém esses achados ainda se encontram inconsistentes, possivelmente, devido ao polimorfismo da PON-1 (LIKIDLILID *et al.*, 2010).

Paragh *et al.* (1998) demonstraram atividade da PON-1 reduzida em pacientes urêmicos em HD ($p < 0,001$) e hiperlipidêmicos ($p < 0,01$) quando comparada com a atividade de pacientes saudáveis, além disso, foi encontrado menor atividade sérica da PON-1 nos pacientes urêmicos em HD ($p < 0,001$) em comparação ao grupo dos indivíduos hiperlipidêmicos. Em outro estudo realizado por Sztanek *et al.* (2012), no qual os autores

propõem a PON-1 como um novo biomarcador de DCV na DREF, encontraram menor atividade sérica da PON-1 no grupo de pacientes com DREF ($p < 0,05$) quando comparado com os pacientes transplantados e grupo controle (saudáveis), demonstrando que a atividade da PON-1 parece ser parcialmente restaurada após o transplante renal. Desta forma, além da atividade, as concentrações séricas da PON-1 parecem estar diminuídas na DRC, assim como Suehiro *et al.* (2002) através de um ensaio imunoenzimático mediram a concentração da PON-1 no soro de 81 pacientes em HD e em 103 indivíduos saudáveis, encontraram redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a concentração sérica da PON-1 no grupo em HD ($6,78 \pm 3,56$) em comparação aos pacientes sadios ($18,01 \pm 4,55$). Entretanto, nenhum destes estudos investigaram a atividade sérica desta enzima antes e depois da HD.

Ainda não há consenso entre os diversos autores sobre o mecanismo responsável pela redução da PON-1 na DREF. Conforme Gugliucci *et al.* (2012) as toxinas urêmicas (ureia, creatinina, produtos de glicação avançada e ácido úrico) podem ser potentes mediadores que causam deficiência na atividade enzimática da PON-1. Gugliucci *et al.* (2007) realizou um experimento *in vitro* onde os autores incubaram o ultrafiltrado do soro de pacientes com DREF com a paraoxonase e compararam com o grupo controle (pacientes sadios), neste trabalho eles observaram a redução da atividade da PON-1 no grupo com DREF ($p < 0,001$). Estes resultados foram confrontados por Rajković *et al.* (2010) em que os autores também examinaram *in vitro* a hipótese da possível inibição da atividade enzimática (PON-1) por toxinas urêmicas com o ultrafiltrado do soro de pacientes com DREF quando comparado com o grupo controle (sadios) e não houve diferença significativa entre os grupos estudados. De acordo com os autores, apesar de não ter havido diferença significativa, é possível que algum soluto proveniente da retenção urêmica possa atuar na regulação da expressão gênica da PON-1 (concentração e atividade) justificando as divergências entre os estudos. Outros trabalhos têm indicado que a redução da atividade da PON-1 na DREF está associada à inflamação (LAHRACH *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2012). Pelo exposto o comportamento da paraoxonase na DREF tem sido bastante investigado, entretanto, são escassas as informações sobre a possível interferência da HD na atividade desta enzima.

1.5. DISLIPIDEMIA URÊMICA

A dislipidemia urêmica é uma complicação da DRC que se diferencia profundamente da dislipidemia na população geral, dada a sua complexidade, pois ela é caracterizada

(principalmente) pelos baixos níveis séricos do HDL-C e aumento sérico dos triglicérides ao invés do aumento do CT e LDL-C (SCHLITT *et al.*, 2007). Contudo, um ensaio clínico randomizado realizado por Wanner *et al.* (2005) com pacientes em hemodiálise, entre os quais a média de incidência anual de infarto agudo do miocárdio ou morte por DAC era de 8,2% por ano, falhou em demonstrar o benefício da redução dos níveis séricos do LDL-C nos pacientes em HD, sugerindo que a redução sérica do HDL-C, ao invés do aumento do LDL-C possa ser possível marcador da dislipidemia na DRC.

Embora a natureza da dislipidemia possa ser significativamente influenciada por diversos fatores intrínsecos (proteinúria nefrótica, doenças concomitantes como o diabetes mellitus e as alterações hereditárias do metabolismo lipídico) ou fatores extrínsecos (eritropoetina, esteroides e inibidores de calcineurina) (LACQUANITI *et al.*, 2010; KEANE *et al.*, 2013), a dislipidemia urêmica está associada à contínua e severa desregulação de enzimas-chave participantes do metabolismo da HDL e de lipoproteínas rica em triglicérides, resultando em deficiência da HDL e hipertrigliceridemia (NOSRATOLA e NORRIS, 2011; S. C. CHEN *et al.*, 2013; KEANE *et al.*, 2013).

1.5.1. Triglicérides e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL)

A hipertrigliceridemia e o aumento da concentração sérica do colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C) persistem em diversas fases da insuficiência renal, em especial, na DREF e naqueles em DP. A hipertrigliceridemia reflete o aumento da síntese hepática e decréscimo do catabolismo da VLDL e seus remanescentes (β -VLDL), devido à diminuição da atividade das enzimas lipolíticas, dentre elas, lipoproteína lipase (LPL) e lipase hepática (VARIZI, 2009; YAMAMOTO e KON 2009). Assim como o *downregulation* dos receptores de VLDL no tecido adiposo, músculo esquelético e cardíaco (Figura 04), além do aumento plasmático da relação apo CIII (inibidor de LPL) e apo CII (ativador de LPL) (KWAN *et al.*, 2007; SHOJI *et al.*, 2011; TSIMIHODIMOS *et al.*, 2011; NOSRATOLA e NORRIS, 2011).

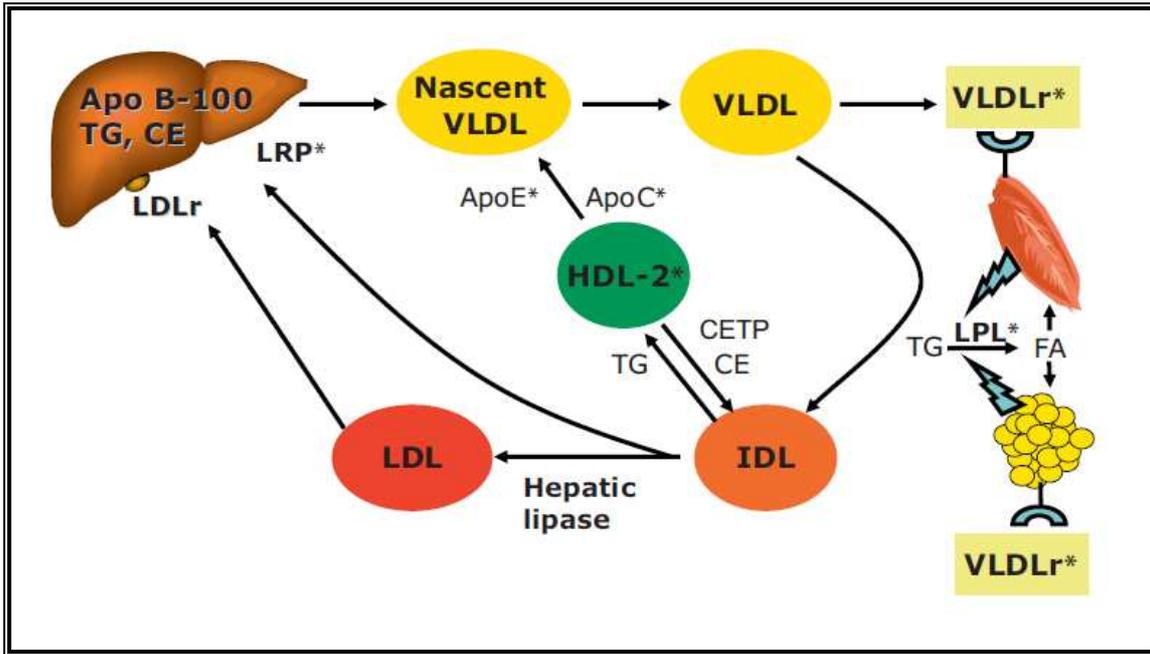


Figura 3. Via metabólica da VLDL.

A DRC induz o downregulation (marcado com asterisco) da LPL (lipase lipoproteica), LRP (proteína relacionada ao receptor de LDL) e VLDLr (receptor da VLDL) que em conjunto provocam a hipertrigliceridemia. Fonte: Varizi & Norris (2011).

A elevação dos TG também reflete o *upregulation* da acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT) hepática, proteína de transferência que auxilia nos hepatócitos com a incorporação de triglicérides (TG) na lipoproteína VLDL, o decréscimo do catabolismo do TG induz ao acúmulo de partículas de LDL pequenas e densas. O comprometimento metabólico decorrente da DRC, em parte, pode provocar modificações pós – traducionais das apolipoproteínas como oxidação, glicação e carbamilação (YAMAMOTO e KON, 2009). De acordo com Lacquaniti *et al.* (2010) o *downregulation* de diversos genes, juntamente com a modificação da composição das lipoproteínas e o efeito inibitório de várias toxinas urêmicas presentes na DRC, representam mecanismos fisiopatológicos importantes da hipertrigliceridemia na doença renal.

1.5.2. Colesterol e Lipoproteína de baixa densidade (LDL)

Cerca de 90% do colesterol endógeno é sintetizado para atender as necessidades fisiológicas, no entanto essa macromolécula pode também ser obtida a partir da dieta. A enzima hidroxil-3-methyl-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) regula síntese do colesterol (CHMIELEWSKI *et al.*, 2008; VAZIRI, 2009). Apesar dos níveis do colesterol total se apresentar entre os valores de normalidade na DRC (KEANE *et al.*, 2013).

Chmielewski *et al.* (*ib*), demonstraram em ensaio experimental que a expressão gênica e a atividade da HMG-CoA redutase se encontrava significativamente aumentada em ratos nefrectomizados. Entretanto, outros estudos demonstraram que apenas quando a doença renal cursa com proteinúria nefrótica há significativo *upregulation* da HMG-CoA redutase (VAZIRI, 2009).

A apolipoproteína B100 (apo B) é sintetizada no fígado e faz parte de modo predominante das principais frações lipoproteicas consideradas aterogênicas (VLDL, IDL e LDL), cujo colesterol é variável. A apo B é essencial para ligação das partículas de LDL aos receptores celulares, permitindo a entrada de LDL nas células, assim o excesso de apo B caracteriza um fator desencadeante para processo aterogênico (WALLDIUS e JUNGNER, 2004; BRASCHI *et al.*, 2006).

De acordo com Varizi (*ib*), em modelo murino, partículas de LDL ricas em ésteres de colesterol são retiradas da circulação via receptor de LDL (LDLr) no fígado e tecidos periféricos. Estudos têm demonstrado que a quantidade de LDLr no início da glomeruloesclerose se encontra inalterada, porém, com significativa redução após o seu desenvolvimento, além da presença de proteinúria acentuada. Esse quadro conforme o autor tem como efeito a indução de hipercolesterolemia grave.

Na DRC a concentração sérica do LDL-C está usualmente entre os valores de referência ou discretamente reduzido. Do ponto de vista qualitativo a LDL se apresenta em seu subtipo pequeno e denso, a qual possui alto poder de penetração na parede vascular, e neste local, sofre oxidação (LDLox) sendo endocitado por macrófagos via receptores *scavenger*, dentre eles, SR-AI (*scavenger receptor class AI*) e LOX-1 (*lectin-like oxidized LDL receptor-1*), figura 07, processo que pode dar início a formação de células espumosas, desencadeando o processo aterosclerótico, conforme figura 05 (DIEPEVEEN *et al.*, 2008; MORADI *et al.*, 2009; LACQUANITI *et al.*, 2010; TSIMIHODIMOS *et al.*, 2011).

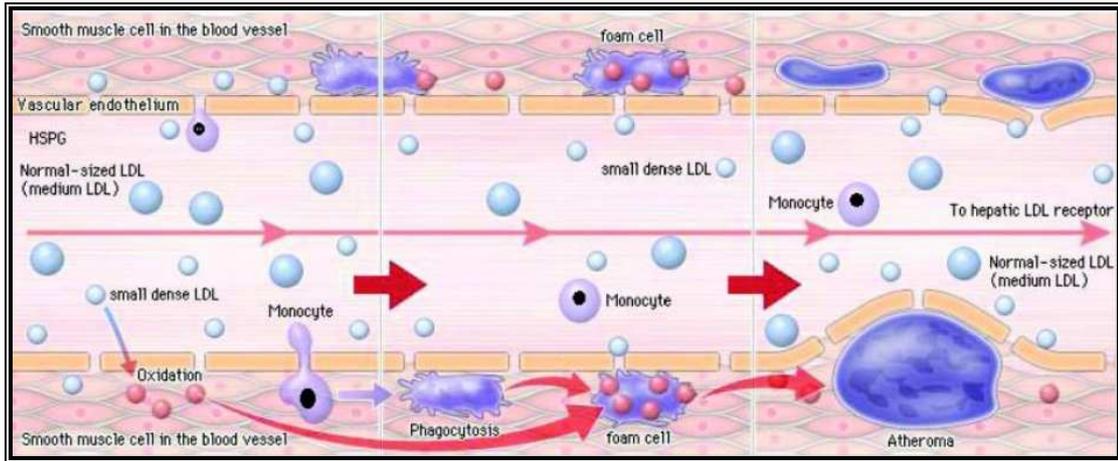


Figura 4. Representação da LDL pequena e densa penetrando na camada íntima, dando início à patogênese da aterosclerose.

Fonte: McCullough *et al.* (2011).

A hiperlipidemia pode acelerar a evolução da doença renal por diversos mecanismos: reabsorção de ácidos graxos, fosfolípidios e colesterol contido no filtrado proteico tubular (albumina e lipoproteínas) podem estimular inflamação tubulointersticial, formação de células espumosas e lesão tecidual (LACQUANITI *et al.*, 2010). Assim como o acúmulo de lipoproteínas no mesângio glomerular promove produção de matriz extracelular e glomeruloesclerose com lipoproteínas oxidadas e nativas, especialmente a LDL, que em cultura de células mesangiais estimula a produção de citocinas pró-inflamatória que podem levar ao recrutamento e ativação de macrófagos circulantes e residentes (VAZIRI, 2006).

A nefrotoxicidade lipídica vem sendo investigada por diversos autores. Hattori *et al.* (1999) induziram hipercolesterolemia em ratos e observaram lesão no tecido renal, a alimentação dos animais rica em colesterol conduziu a formação e infiltração de células espumosas com desenvolvimento de destruição glomerular. Em similar modelo animal, Joles *et al.* (2000) concluiu que a hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia estavam associadas a severa lesão de podócitos e células tubulointersticiais. Porém, resultados em humanos ainda são controversos, pois de acordo com Chawla *et al.* (2010) em estudo de corte com 840 pacientes (DRC) que foram acompanhados por um período médio de 10 anos, não foi encontrado significativa correlação entre hiperlipidemia e doença renal, entretanto, Chen *et al.* (2013) analisou pacientes com doença renal em estágios 3-5 incluindo diabéticos e não diabéticos, verificando que o aumento do colesterol total, LDL-C e não-HDL-C foi associado a progressão da doença renal.

1.5.3. Lipoproteína de alta densidade (HDL)

A lipoproteína de alta densidade (HDL) possui estrutura complexa (figura 06) e faz parte de um grupo de partículas bastante heterogêneo com relação ao tamanho, composição e funcionalidade (YAZDANYAR *et al.*, 2011). A existência de subpopulações distintas da HDL é consistente com o fato de essas partículas exercerem várias funções biológicas (antioxidante, anti-inflamatória, antiapoptóticas, antitrombóticas e anti-infecciosas) (KONTUSH e CHAPMAN, 2006; PODREZ, 2010). Essas subpopulações podem ser identificadas de acordo com suas propriedades físicas, incluindo tamanho, forma, densidade e carga, tais subpopulações podem ser reclassificadas de acordo com diferentes proteínas de transferência lipídica, enzimas, apolipoproteínas e conteúdo lipídico (LEANÇA *et al.*, 2010) e pelo o uso das técnicas de eletroforese bidimensional associada a *western blotting*, a HDL pode ser subdividida em larga e rica em colesterol (HDL_{2a} e HDL_{2b}) e pequena, pobre em lipídios, (HDL_{3a}, HDL_{3b}, HDL_{3c}, pré β -HDL e pré β 2-HDL) (TIAN *et al.*, 2011). As alterações nas concentrações plasmáticas dos lipídios podem alterar a maturação desta lipoproteína, Gou *et al.* (2005) observaram redução do tamanho da HDL em indivíduos hipertrigliceridêmicos do sexo masculino em comparação ao grupo controle (normolipêmicos).

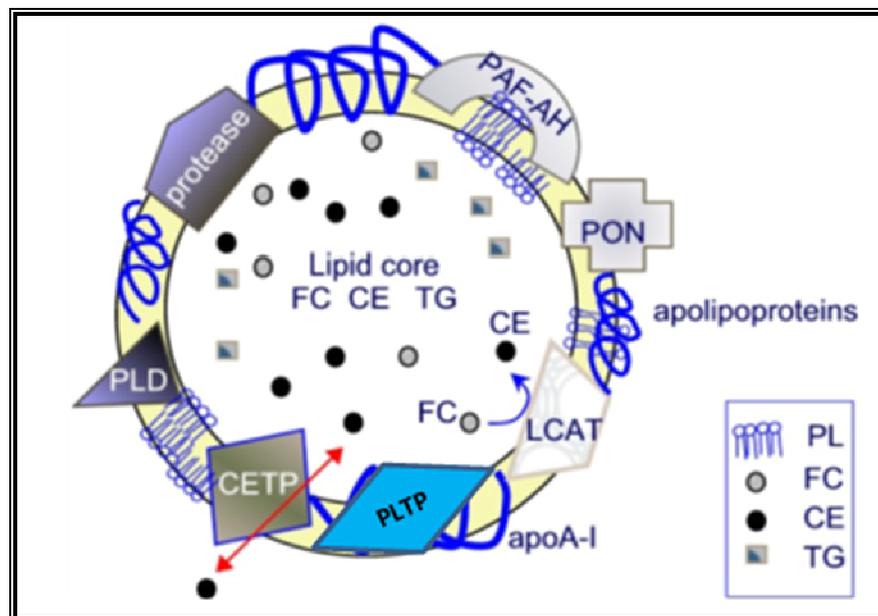


Figura 5. Estrutura da HDL.

Fator ativador de plaquetas (PAF-AH), fosfolipase D (PLD), paraoxonase (PON), Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol (CETP), colesterol livre (FC), colesterol esterificado (CE), triglicérides (TG), fosfolípidios (PL), Lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), Proteína de transferência de fosfolípide (PLTP). Fonte: Modificada de Cho (2009).

A HDL protege contra a aterosclerose a partir de diversos mecanismos, dentre eles: (a) possui na sua constituição enzimas antioxidantes – paraoxonase e glutathione peroxidase - que inibem a oxidação de lipoproteínas e lipídios (figura 05); (b) remove e elimina o excesso de colesterol via apo AI e lecitina colesterol aciltransferase (LCAT); (c) suprime resposta inflamatória via captação e eliminação de endoxinas e fosfolipídios oxidados por ação da apo AI e antioxidação da LDL; (d) ação antitrombótica através da atividade da enzima acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas (PAF-AH), que é potente inibidora da agregação plaquetária; (e) pela capacidade de remover o colesterol de macrófagos ligados ao endotélio, processo dependente de proteínas específica conhecida como *ATP binding cassette transporter A1* (ABCA-1), iniciando o transporte reverso de colesterol, figura 07, (LIMA & COUTO, 2006). No processo aterosclerótico a HDL possui “papel” importante por limitar a modificação ou oxidação de lipídios e/ou lipoproteínas, além de remover o colesterol e fosfolipídios dos tecidos periféricos retornando-os ao fígado para ser excretado pela via biliar e fecal - processo conhecido como transporte reverso (MORADI *et al.*, 2009).

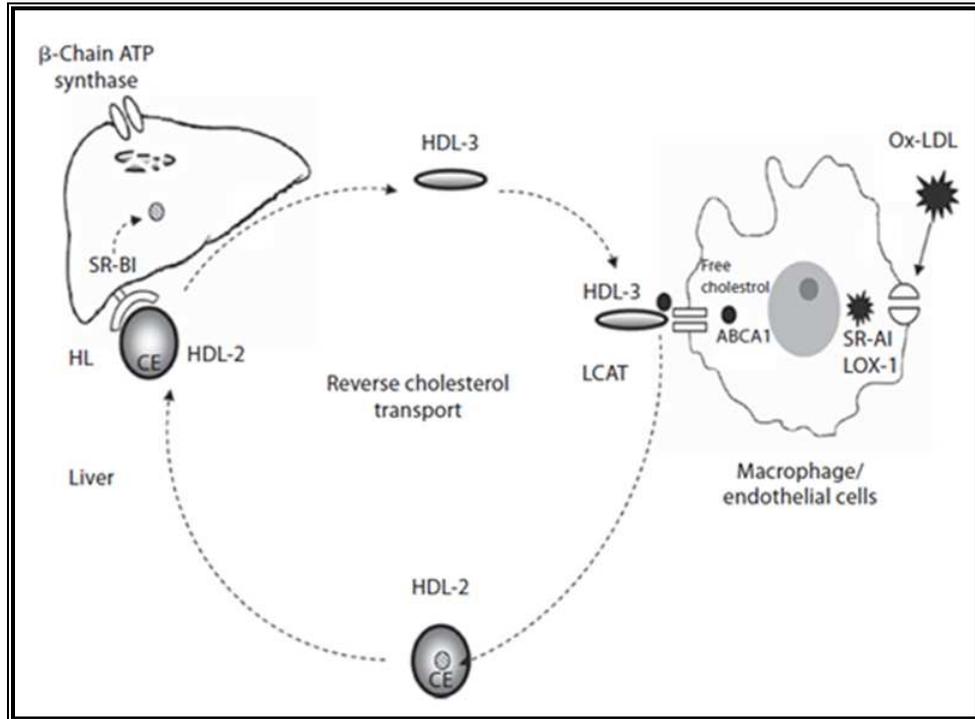


Figura 6. Representação esquemática do transporte reverso do colesterol.

Captação da LDLox pelos receptores scavenger (SR-AI e LOX-1) e efluxo de colesterol livre via ABCA1 e ABCG1 transportadores em macrófagos e células residentes na parede arterial, a transferência de colesterol livre a partir da superfície desta célula para o HDL-3 (pobre em lípidios), a esterificação do colesterol livre, e translocação de ésteres de colesterol para o núcleo da HDL, a entrega pela HDL-2 do colesterol esterificado através do acoplamento receptor SR-BI seguida da liberação da HDL-3 reciclagem ou degradação pela cadeia beta de ATP sintase. Fonte: Modificada de Moradi *et al.* (2009).

Alterações na constituição da HDL provocam distúrbios funcionais desta lipoproteína. A anormalidade lipídica mais frequentemente observada é o aumento dos triglicérides e redução dos fosfolípidios na partícula da HDL, situação observada nos casos de hipertrigliceridemia associado com a diminuição da atividade da lipase lipoproteica, lipase hepática e LCAT ou na alteração combinada destas enzimas, bem como em outros mecanismos que resultem na diminuição sérica do HDL-C (SVIRIDOV *et al.*, 2008; HOLZER *et al.*, 2011). Diversos estudos epidemiológicos demonstraram a relação inversa entre HDL-C e a progressão da aterosclerose, aumentando o risco de DCV na população geral (KAYSEN, 2009; WEICHHART *et al.*, 2012). Alterações na composição lipídica do *core* da HDL, como por exemplo, a substituição de ésteres de colesterol por triglicérides é conhecida por alterar a estabilidade da apo AI pela modificação do domínio C – terminal desta apolipoproteína, esta porção proteica é fundamental para a HDL interagir com os receptores lipídicos (KONTUSH e CHAPMAN, 2006). A apo AI é a apolipoproteína mais abundante da HDL. Alguns estudos sugerem que esta apolipoproteína possui maior capacidade de prever

doença cardiovascular do que as concentrações séricas do HDL-C (colesterol da lipoproteína de alta densidade), pelo fato de traduzir o metabolismo da HDL, assim a apo AI surge como proposta de ser um novo biomarcador de risco DCV (VAN DER STEEG *et al.*, 2008).

1.5.3.1. Proteína de transferência de fosfolípide (PLTP)

A PLTP pertence a uma família de enzimas que realizam a transferência de lipopolissacarídeos, incluindo a proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) e proteína de ligação a lipopolissacarídeos (LBP) (HUUSKONEN *et al.*, 2001; ALBERS *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2012; ROBINS *et al.*, 2013) e pode ser expressa por células e órgãos dentre eles macrófagos, ovário, pulmão, timo, intestino e fígado, este último sendo o principal local de produção e degradação (JIANG *et al.*, 2012; DULLAART *et al.*, 2013). Devido a sua extensa glicosilação, a PLTP é uma proteína monomérica com peso molecular aparente de 81kDa, no plasma ela é encontrada complexada, principalmente, a proteínas (DAY *et al.*, 1994; DULLAART *et al.*, 2013). *In vitro* sua atividade enzimática pode ser medida pela capacidade de transferir fosfolipídios marcados com ^{14}C para HDL purificada (ALBERS *et al.*, 2012). Além de lipopolissacarídeos a PLTP transfere fosfolipídios, α -tocoferol e cerebrosídeos (JIANG *et al.*, 2012). As transferências de lipídios entre HDL e outras lipoproteínas, mediadas pela CETP e PLTP são passos fundamentais na formação da HDL e seu papel no transporte reverso do colesterol (HUUSKONEN *et al.*, 2001). A atuação da PLTP no remodelamento da HDL é influenciado pela composição proteica desta partícula e aumenta significativamente com a presença de triglicérides nesta lipoproteína (OKA *et al.*, 2000; RYE e BARTER, 2014). Desta forma, alguns trabalhos tem descrito que a PLTP plasmática possui duas formas: uma ativa, com capacidade de transferir a fosfatidilcolina de vesículas de fosfolipídios para a HDL, associada a Apo AI (figura 05), e outra inativa, tem pouca ou nenhuma capacidade de transferência de fosfolipídios, ligada a Apo E (OKA *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 2012).

É amplamente descrito na literatura que a PLTP possui múltiplas e complexas funções no metabolismo lipídico, dentre elas: (a) facilita a transferência de fosfolipídios e colesterol livre de lipoproteínas ricas em triglicérides para a HDL durante a lipólise intravascular; (b) a sua atividade resulta na conversão de HDL₃ madura em HDL₂ larga e em pequenas partículas de pré β -HDL - essa habilidade de gerar partícula que é excelente aceptora de colesterol traduz a importante participação da PLTP no transporte reverso do colesterol; (c) atenua

resposta inflamatória através da transferência de lipopolissacarídeos (LPS) para a HDL₃; (d) transfere α -tocoferol provenientes da HDL para membranas celulares, agindo como antioxidante; (e) estimula o efluxo de colesterol das células espumosas (macrófagos modificados) pela modulação da proteína transportadora ABCA1, onde a pré β -HDL será acceptora deste colesterol (HUUSKONEN *et al.*, 2001; ALBERS *et al.*, 2012; DULLAART *et al.*, 2013). Assim, a PLTP promove tanto a formação da HDL como participa, na circulação sanguínea, do remodelamento desta lipoproteína (ROBINS *et al.*, 2013).

A expressão da PLTP é aumentada em algumas condições fisiopatológicas que são fatores de risco para doença cardíaca coronariana, dentre elas a obesidade, resistência à insulina e no diabetes tipo 1 e 2 (YAZDANYAR *et al.*, 2011). A atividade desta enzima é elevada na obesidade, diabetes tipo 2 e se mantém inalterada na hipertripliceridemia (HUUSKONEN *et al.*, 2001). Ensaios experimentais tem investigado o papel pró-aterogênico da PLTP. Em 2002 um trabalho realizado por Van Haperen *et al.* relataram que o aumento da atividade da PLTP provoca predisposição ao desenvolvimento da aterosclerose pela diminuição da concentração plasmática da HDL. Moerland *et al.* (2008) em um estudo com camundongos *knockout* para LDLr constataram que a elevação da atividade da PLTP desestabiliza a lesão aterosclerótica e agrava o perfil lipoproteico pró-aterogênico. Yazdanyar & Jiang (2012) demonstraram em modelo com camundongos geneticamente modificados que a superexpressão da PLTP aumentou a síntese hepática da VLDL. Resultado similar foi obtido por Masson *et al.* (2011) que verificaram o aumento dos níveis séricos de lipoproteínas ricas em triglicérides na presença da PLTP, porém observaram que não houve alteração no nível sérico do HDL-C, assim como não foi modificada a propriedade antioxidante da HDL. Entretanto, em recentes estudos *in vitro* foi sugerido que a PLTP pode ter papel protetor na trombose (OSLAKOVIC *et al.*, 2009; OSLAKOVIC *et al.*, 2010).

Em humanos os estudos que tratam do impacto da PLTP no desenvolvimento de doenças DCV são controversos. De Vries *et al.* (2006) avaliou 87 pacientes com diabetes tipo 2 e 83 controles (pacientes saudáveis), os autores observaram que houve associação positiva entre o aumento da atividade da PLTP e presença de espessamento da camada íntima e média da artéria carótida no grupo de pacientes com diabetes tipo 2, sugerindo que a alta atividade da PLTP está envolvida no processo de aterosclerose acelerado. Schgoer *et al.* (2008) utilizou uma população amostral de 53 indivíduos com sintomas de doença arterial periférica e 208 controle (sem sintomas de doença arterial periférica), foram excluídos os pacientes fumantes e portadores de diabetes mellitus, e constaram que a atividade da PLTP foi significativamente reduzida no grupo com sintomas de doença arterial periférica quando comparado com o grupo

controle ($p=0,001$). X Chen *et al.* (2009) realizaram um estudo com 215 pacientes (sem) e 407 pacientes com doença cardíaca coronariana e observaram que não houve diferença significativa entre a atividade da PLTP e o grupo de pacientes sem e com doença cardíaca coronariana. Na tentativa de esclarecer os contraditórios resultados anteriores e partindo do pressuposto de que o aumento da atividade da PLTP eleva as concentrações plasmáticas do HDL-C, Robbins *et al.* (2013) resolveram investigar no período entre 1995-1998 a associação do aumento da atividade desta enzima e a elevação do risco de desenvolvimento de DCV, os autores incluíram no estudo 2679 indivíduos (56% do sexo feminino), observaram que o aumento da atividade da PLTP foi associada a elevação da incidência de DCV apenas no grupo de pacientes do sexo masculino e não explicaram a razão deste achado. Os autores ressaltam que este foi o primeiro estudo em que o HDL-C baixo não pode ser considerado como uma variável de confusão.

Apesar dos dados a cerca da PLTP ainda se apresentarem de modo contraditório, estudos atuais se concentram em duas principais formas de atuação da PLTP, no remodelamento da HDL e na indução do aumento dos níveis plasmáticos de lipoproteínas rica em apo B (COLHOUN *et al.*, 2002).

1.6. BIOÍNDICES

A estimativa de risco cardiovascular utilizando razões lipídicas vem sendo bastante utilizada pela comunidade científica nos últimos anos, especialmente, para indivíduos hipertrigliceridêmicos e/ou com o HDL-C abaixo do nível de normalidade, pois o rastreamento isolado de parâmetros lipídicos pode não ser suficiente fator preditor do risco DCV (MAY *et al.*, 2013) e nos últimos anos diversos autores têm utilizado essas razões como ferramenta para avaliar o risco cardiovascular na DREF (KIRMIZIS *et al.*, 2007; KIMAK *et al.*, 2011; ROEHRS *et al.*, 2011; CABARKAPA *et al.*, 2012).

A presença da hipertrigliceridemia aumenta a atividade da lipase hepática que resulta na elevação do catabolismo do HDL-C (AL-TAI *et al.*, 2012). Recentes estudos tem relacionado à razão TG/HDL-C ao risco de desenvolvimento de DCV (HADAEGH *et al.*, 2009; BERTOLUCI *et al.*, 2010; PARAMSOTHY *et al.*, 2010), a elevação sérica dos TG e redução do HDL-C está associado à presença de LDL pequena e densa (LEMIEUX *et al.*, 2001), desta forma, o índice TG/HDL-C classifica a LDL em dois distintos fenótipos: para valores acima de 3,8 (79% de fenótipo B) e menor do que este valor (81% de fenótipo A) (DA

LUZ *et al.*, 2008), assim Yunke *et al.* (2013) observaram a associação desta razão com a severidade da doença coronariana, os autores sustentaram que essa relação se deva a presença do fenótipo B (subtipo de LDL pequena e densa), devido ao sua capacidade de penetrar na parede arterial e se depositar sob o endotélio mais facilmente que as partículas maiores, e por estas lipoproteínas apresentarem maior susceptibilidade à oxidação, o que aumenta a sua aterogenicidade. Outra classificação que reedita a análise da presença sérica de LDL pequena e densa é a transformação logarítmica da razão TG/HDL-C, o chamado índice aterogênico do plasma (IAP) que classifica o risco de acordo com três categorias: baixo $< 0,11$, intermediário $0,11-0,21$ e alto $> 0,21$ (AL-TAI *et al.*, 2012; CABARKAPA *et al.*, 2012). Recente estudo investigou a associação entre IAP e o espessamento da íntima-média da carótida (marcador de aterosclerose subclínica) de pacientes em HD e encontrou forte correlação positiva entre ambas as variáveis estudadas em comparação ao grupo controle, estes resultados sugerem que o índice IAP pode ser utilizado como parâmetro para intervenções que atuem na regressão da aterosclerose subclínica (YILDIZ *et al.*, 2013).

O índice apo B/apo AI reflete balanço do transporte de colesterol, consideram-se como risco valores superiores a 0,9 no homem (FORTI e DIAMENT, 2007; HUANG *et al.*, 2013), figura 08. Um importante estudo de caso controle, o INTERHEART, demonstrou que a razão apo B/apo AI é potencial fator preditor de risco para DAC (YUSUF *et al.*, 2004). Em outro trabalho utilizando-se de medidas ultrassônicas foi observada a associação entre o aumento desse índice e aterosclerose subclínica (PANAYIOTOU *et al.*, 2008). Walldius *et al.* (2001) selecionaram 175.553 indivíduos e avaliaram a relação entre o risco de morte por infarto agudo do miocárdio e parâmetros lipídicos, neste estudo houve acompanhamento médio de 66,8 meses (98.722 homens) e 64,4 meses (76.831 mulheres), durante os quais 864 homens e 359 mulheres tiveram IAM (infarto agudo do miocárdio) fatal, os autores concluíram que o índice apo B/apo AI foi melhor fator preditor de morte por infarto agudo do que o LDL-C. Kirmizis *et al.* (2007) sugeriram a inclusão da razão apo B/apo AI para avaliar risco cardiovascular de pacientes em hemodiálise pelo fato destas moléculas serem estáveis e não sofrerem com o estado inflamatório crônico desta população.

O guia clínico da Sociedade Europeia de Cardiologia e Sociedade Europeia de Aterosclerose recomenda que o índice não-HDL-C é melhor indicador de risco do que o LDL-C, especialmente, para pacientes com hipertrigliceridemia associada à DRC (REINER *et al.*, 2011), provavelmente, devido ao fato da análise isolada do LDL-C ignorar as lipoproteínas ricas em TG e pela dificuldade de se obter amostras sanguíneas (no jejum) dos pacientes em HD, uma vez que os níveis séricos dos TG são sensivelmente alterados no desjejum, levando

a fórmula de Friedwald a diminuir o LDL-C (falso negativo), assim o não-HDL-C pode ser melhor parâmetro lipídico na rotina clínica dos pacientes com DREF (NISHIZAWA *et al.*, 2003). O não-HDL-C é o resultado da subtração entre o CT e HDL-C, já a relação não-HDL-C/HDL-C estima o nível sérico de lipoproteínas que contém apo B, figura 08 (REINER *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2013).

A elevação da razão CT/HDL-C é observada na hipertrigliceridemia e muitas vezes acompanhada de outras alterações metabólicas, incluindo o aumento sérico das lipoproteínas que contém apoB e presença de LDL pequena e densa (NAIR *et al.*, 2009), assim a relação CT/HDL-C vem sendo utilizada como importante fator preditor de risco cardiovascular (LEMIEUX *et al.*, 2001; GIMENO-ORNA *et al.*, 2005; KAPPELLE *et al.*, 2013) e diversos estudos tem demonstrado que este índice é melhor marcador de risco cardiovascular do que o CT, LDL-C e a razão LDL-C/HDL-C (HANAK *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008), achados que foram confirmados por Nair *et al.* (2009) ao avaliar a associação entre parâmetros lipídicos e DAC proximal obstrutiva e não obstrutiva em uma população de 295 pacientes encaminhados para angiografia entre 2004 e 2006. Como referência valores da relação CT/HDL-C abaixo de 5,1 é considerado baixo risco e acima de 5,8 alto risco cardiovascular (sexo masculino) (CASTELLI *et al.*, 1983).

A dosagem de HDL-C mede apenas o *pool* da HDL, entretanto, a relação HDL-C/apo AI estima a composição desta lipoproteína (ABBASI *et al.*, 2013b), modificações na sua constituição alteram a participação dessa partícula no transporte reverso do colesterol, desta forma, a vantagem em utilizar este índice é a possibilidade de se avaliar o estado funcional da HDL que é alterado em pacientes com hipertrigliceridemia e HDL-C abaixo do valor de referência (BRITES *et al.*, 2000). Outro índice que vem sendo bastante utilizado é a redução da razão LDL-C/apo B que está independentemente associada ao risco cardiovascular e pode também servir para monitorar a LDL no aspecto qualitativo em pacientes com elevados níveis de triglicérides séricos (KWON *et al.*, 2011; TANI *et al.*, 2011). Navarro *et al.* (2003) em estudo transversal avaliaram o efeito da atorvastatina (10mg/dia) durante 04 meses sobre o perfil lipídico e razões de risco cardiovascular (medidos e calculados no início e ao final do estudo) em pacientes com diabetes mantidos em HD e dentre os resultados obtidos, verificaram o aumento da relação LDL-C/apo B ($p < 0.01$) nesta população, efeito que pode ser crítico na redução da mortalidade de indivíduos em HD.

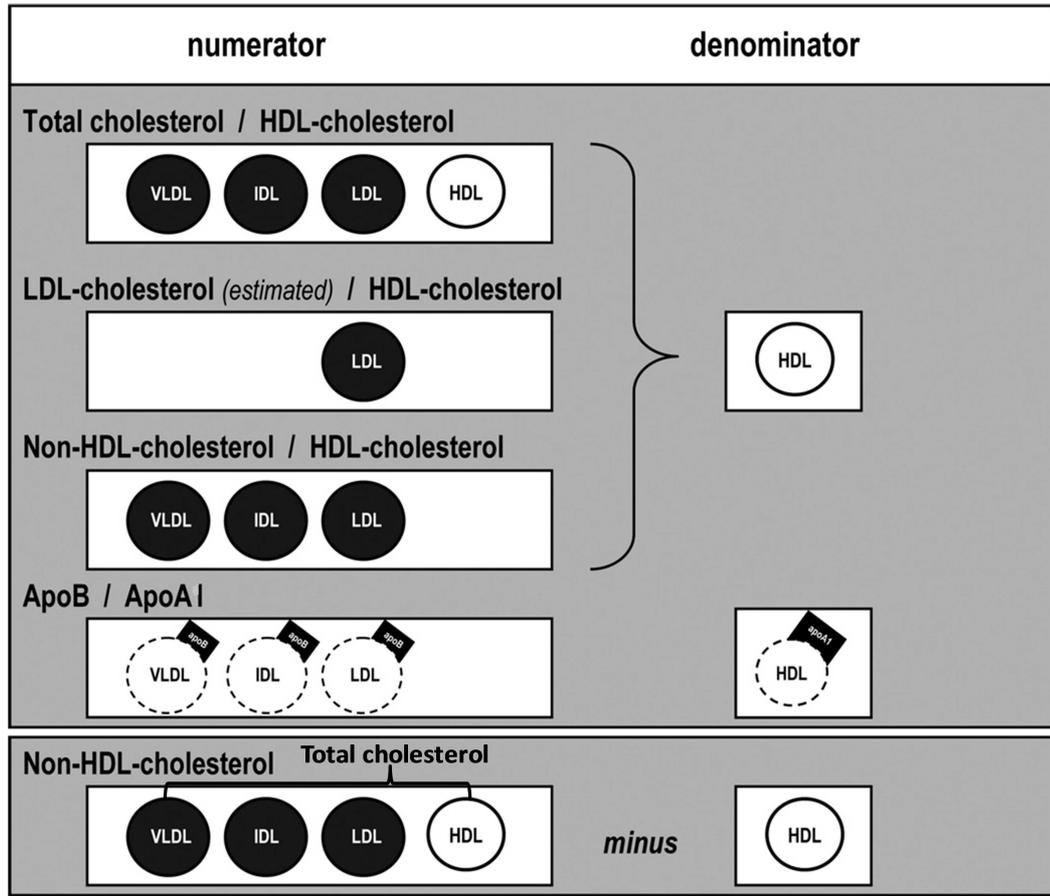


Figura 7. Ilustração da constituição lipídica dos índices de risco cardiovascular (CT/HDL-C; LDL-C/HDL-C; não-HDL-C/HDL-C; apo B/apo AI e não-HDL-C). As esferas pretas representam o conteúdo lipídico aterogênico das lipoproteínas, as esferas brancas o conteúdo lipídico antiaterogênico, os círculos vazados representam as lipoproteínas que contém apo B e apo AI. Os desenhos não representam o tamanho real das lipoproteínas. Fonte: Modificada de Hermans *et al.*(2007).

2. JUSTIFICATIVA

A doença cardiovascular é a principal causa de morte em pacientes com DREF. As causas de mortes relacionadas à doença cardíaca, nesta população, estão diretamente associadas a processos ateroscleróticos. Pacientes em hemodiálise são expostos a diversos fatores heterogêneos que resultam em anormalidades lipídicas funcionais, qualitativas e quantitativas. Tais alterações lipídicas são marcadas pela desregulação de numerosas enzimas, apolipoproteínas e receptores celulares, além das modificações na maturação e metabolismo da HDL. Além disso, a dislipidemia urêmica é principalmente caracterizada pela hipertrigliceridemia, aumento VLDL-C e diminuição do HDL-C, em quanto o CT e LDL-C se encontram abaixo ou dentro dos valores de referência.

As modificações no metabolismo lipídico (e.g. o remodelamento da HDL) são dinâmicas, o tamanho e a composição das lipoproteínas são regulados por proteínas de transferência de lípidos, por exemplo, a PLTP. Além disso, alguns estudos em animais e humanos vem demonstrando que alterações na atividade desta enzima tem sido associada a eventos cardiovasculares. Especula-se que as propriedades inflamatórias da PLTP contribuam para os efeitos pró-aterogênicos, entretanto, o exato mecanismo que envolve a PLTP na aterogênese ainda não foi elucidado. Outra enzima que também está ligada a HDL é a PON-1 que também ajuda a manter a estabilidade desta partícula, sendo a principal enzima responsável pela função antioxidante, os estudos tem mostrado claramente a função ateroprotetora da PON-1, por inibir a oxidação da LDL.

Diversos estudos tem citado as razões lipídicas como melhores indicadores de risco cardiovascular do que apenas a análise isolada destes parâmetros, em especial para condições hipertrigliceridêmicas, assim tais bio índices vem sendo utilizados para avaliar o risco cardiovascular na DREF. A maioria dos dados sobre a PLTP, PON-1 e perfil lipídico na DREF são gerados a partir de estudos que comparam pacientes em HD com transplantados e grupo controle (saudáveis). Portanto é de suma importância a investigação da possível atuação moduladora da HD nestas enzimas, perfil lipídico e por conseqüente o remodelamento da HDL para que se possa propor um biomarcador de risco cardiovascular nesta população.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da hemodiálise sobre o remodelamento das partículas de HDL através da incorporação *in vitro* de fosfolipídios (PLTP) entre as lipoproteínas plasmáticas e a capacidade antioxidante da HDL (PON-1), perfil lipídico e razões de risco cardiovascular.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a capacidade aceptora (incorporação) de fosfolipídio na HDL para avaliar indiretamente a atividade da PLTP no remodelamento da HDL/fase plasmática do transporte reverso do colesterol;
2. Determinar a atividade da Paraoxonase;
3. Determinar a concentração apo AI, apo B e cálculo das estimativas de risco;
4. Determinar as concentrações de proteínas totais e albumina.
5. Realizar correlações lineares entre as variáveis de risco estudadas.

4. METODOLOGIA

4.1. DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

A pesquisa baseou-se estudo experimental do tipo antes e depois desenvolvido em colaboração com o Hospital Ana Neri - Salvador, o Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia e o Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA. A amostra populacional foi selecionada por conveniência no Hospital Ana Neri, composta por 50 pacientes do sexo masculino com DREF, estratificados a cada 10 anos conforme recomendação da V Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose (XAVIER *et al.*, 2013), Tabela 3, moradores da Bahia, entre 32 e 72 anos. Os pacientes se encontravam em hemodiálise há no mínimo 03 meses e máximo de 84 meses. Eram submetidos às sessões de HD durante 3-4 horas (na frequência de três vezes por semana) com membrana dialisadora sintética (polissulfona) de baixo fluxo, solução dialisadora básica (bicarbonato) e heparina não fracionada (Hemofol®). Todos os participantes foram informados e concordaram com o estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido.

Tabela 3. Classificação dos participantes do estudo estratificados por faixa etária conforme critérios da V diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose (2013).

Faixa etária (anos)	N	%
30 – 39	10	20
40 – 49	14	28
50 – 59	11	22
> 60 anos	15	30
Total	50	100

Abreviação: número de indivíduos (n);

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Sexo masculino;
- Idade entre 32 e 72 anos;
- Doença renal em estágio final;
- Termo de consentimento livre e pré-esclarecido (TCLE) assinado;

- Realização de hemodiálise eletiva no Hospital Ana Neri.

4.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Estar apenas em hemodiálise;
- Estar realizando tratamento conservador;
- Não assinar o Termo de Consentimento Livre e Pré-esclarecido (TCLE);
- Estar internado por qualquer motivo.

4.4. DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS

As determinações laboratoriais foram realizadas em amostras de soro obtidas antes e depois da sessão de hemodiálise. As concentrações de colesterol total (CT), suas frações, triglicérides (TG), HDL-C, proteínas totais e albumina foram determinadas por métodos enzimáticos (reações de ponto final). As determinações do LDL-C foram realizadas por método homogêneo direto (LDL-C direto, BioSystems®, Espanha). Foram utilizados dois equipamentos, um semi-automatizado StarDust MC15 (Diasys, Alemanha) e automatizado LabMax 240, Clinical Chemistry Analyzer (LABTEST, Brasil). As concentrações de apoAI e apoB foram determinadas por imunonefelometria através do analisador IMAGE® (BeckmanCoulter, USA).

4.5. INCORPORAÇÃO DE FOSFOLÍPIDES NA HDL

A incorporação de fosfolípides foi determinada a partir dos dados de contagem de cintilação dos fosfolípides marcados com carbono 14 (PL-¹⁴C) na amostra total, em comparação à cintilação da fração da amostra que contém somente a HDL (após precipitação). Este método *in house*, foi desenvolvido com base no princípio do método do substrato exógeno (STOKKE e NORUM, 1971; CHANNON *et al.*, 1990), ou seja, para cada amostra, 1,0 (um) microlitro de PL-¹⁴C (cerca de 0,4μCi/mL) foi adicionado em 500 microlitros de soro e, após homogeneizado em vortex, submetidos à temperatura de 0 – 4° C (temperatura que se espera a inatividade da PLTP) por uma hora, visando estabelecer o equilíbrio entre PL endógeno da amostra e o PL-¹⁴C adicionado. Decorrido este tempo,

incubou-se à 37° C (temperatura onde a PLTP é ativa), sob agitação constante, por uma hora. Após este tempo esfriou-se a amostra em banho de água com gelo para paralisar a reação. 250 microlitros deste soro marcado foram separados para leitura de fundo (radioatividade total de cada amostra). Nos outros 250 microlitros da amostra marcada foram adicionados 250 microlitros de reagente precipitante preparado previamente com sulfato de dextran 0,2% e MgCl₂ 3,0 Molar, v/v, para precipitar as lipoproteínas que contém apo B. Em seguida, centrifugou-se, sob refrigeração, por 10 minutos a 3.000 rpm e separou-se o sobrenadante, que contém HDL, para posterior determinação da radioatividade presente. Para a determinação das radioatividades nas amostras foi utilizado o equipamento para detecção da cintilação líquida (Multilabel Detection Platform - Hidex Chamaleon). Cada amostra foi dividida em cinco alíquotas de 50 microlitros. Em placas de ELISA com 96 poços, tomando o cuidado de utilizar poços intercalados para evitar interferências entre as amostras, em cada poço foram adicionados uma das alíquotas de 50 microlitros e 250 microlitros de solução cintiladora Ultima Gold (High flash-point LSC-cocktail for counting aqueous and non-aqueous samples – PerkinElmer, Inc, Waltham, USA). A incorporação de PL foi expressa como percentual de PL-¹⁴C a partir das contagens por minuto obtidas no equipamento de cintilação líquida, em uma hora, em relação à radioatividade total adicionada na amostra.

4.6. ATIVIDADE DA PARAOXONASE

A atividade da Paraoxonase foi determinada de acordo com o método descrito por Mackness *et al.* (1998) e Senti *et al.* (2003). Adicionou-se de 140 uL de tampão Tris-HCl 0.1M, pH 8.05, contendo 2mmol/L de CaCl₂ e 1.1 mmol/L de paraoxon (Sigma Chemical Co.) a 7uL de soro. A amostra foi distribuída em placa de 96 poços em duplicata. A leitura foi feita em comprimento de onda de 405nm e temperatura de 37°C utilizando “Leitor de Microplacas” (Microplate Reader, Benchmark, BIO-RAD). Para cálculo da atividade, foram feitas seis leituras em intervalo de um minuto cada, sendo que o resultado foi obtido multiplicando-se a média da variação das absorbâncias pelo fator.

Fator = $VTR (mL) / \epsilon_{405} \times VA (mL) \times E (cm)$, onde:

VTR - Volume total da reação

VA – Volume da amostra

E – Espessura da cubeta

ϵ_{405} – 1805 L M⁻¹ cm⁻¹

Logo, atividade da Paraoxonase = Fator x Δ abs/min

4.7. BIOINDICES

Foram calculados os parâmetros lipídicos não-HDL-C (=TC - HDL-C), TG/HDL-C, apoB/apoAI, TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, HDL-C/apoAI, LDL-C/apoB, não-HDL-C/HDL-C e *atherogenic index of plasma* (AIP) = $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$. Como TG/HDL-C não obteve distribuição normal em todos os subgrupos foi utilizado o $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ para confirmação dos resultados. Para AIP os pacientes foram classificados de acordo com três categorias de risco: baixo <0,11, intermediário 0,11-0,21 e alto >0,21 (CABARKAPA *et al.*, 2012).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva dos dados foi realizada a partir da determinação das estimativas de centralidade e dispersão para obtenção de medidas resumo, seguida do teste de normalidade de *D'Agostotino e Pearson Omnibus* para avaliar o tipo de distribuição dos dados. Em seguida, com base nas informações, para os dados com distribuição normal foram utilizados testes paramétricos, quando não apresentou padrão de normalidade foram utilizados testes não paramétricos. Os dados analisados foram considerados significativos quando $p < 0,05$ para intervalo de confiança de 95%. Precedendo qualquer análise estatística, foi realizado o teste de *Grubb* para detecção de *outlier* por grupo de variáveis estudadas. Para a análise dos dados foi utilizado o *GraphPad Prism 5.01* (*GraphPad Software, Inc., CA, USA*).

O coeficiente de correlação linear de Pearson foi aplicado para avaliar a correlação entre dois parâmetros diferentes no mesmo grupo quando os dados apresentavam menos dispersão em torno da reta (homocedasticidade) e aqueles que se mostravam heterocedásticos foi utilizado o coeficiente de correlação linear de *Spearman*.

5. RESULTADOS

Todos os resultados obtidos sobre perfil lipídico, razões lipídica, PON 1 e incorporação de fosfolípidos na HDL dos pacientes em HD, foram resumidos e organizados em forma de um único artigo intitulado *Hemodialysis alters lipid parameters, paraoxonase activity in vitro incorporation of phospholipids*. O referido trabalho foi submetido para publicação no *Journal Clinical Chemistry*, e no momento estamos aguardando um retorno dos revisores da revista.

5.1. CAPÍTULO

Hemodialysis alters lipid parameters, paraoxonase activity and in vitro incorporation of phospholipids

Franciane S. Marques ^(1, 2, 3), Alysson Luiz M. da Silva ⁽²⁾, Milena Botelho Pereira Soares ⁽⁴⁾, Roque Aras ⁽⁸⁾, Rogério Jorge B. de Oliveira ⁽⁵⁾, Raul C. Maranhão ^(6,7), Fabio D. Couto ⁽⁹⁾, Ricardo D. Couto ^(1, 2, 8)

- (1) PGBSMI/Gonçalo Moniz Research Center (CPqGM), FIOCRUZ Foundation Center, Salvador, Bahia, Brazil;
- (2) Clinical Biochemistry Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia/UFBA, Salvador, Bahia, Brazil;
- (3) Department of Biofunction, Health Institute of Science, Federal University of Bahia/UFBA, Salvador, Bahia, Brazil;
- (4) LETI Research Laboratory, Gonçalo Moniz Research Center, FIOCRUZ Foundation Center, Salvador, BA, Brazil;
- (5) Naval Hospital of Salvador, Brazilian Marine Forces, Salvador, Bahia, Brazil;
- (6) Lipid Metabolism Laboratory of the Heart Institute (InCor) Clinical Hospital of Medical School, University of São Paulo/USP, São Paulo, Brazil;
- (7) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Clinical Chemistry Department, University of São Paulo/USP, São Paulo, Brazil;
- (8) Ana Neri Hospital, SESAB and Federal University of Bahia/UFBA, Salvador, Bahia, Brazil;
- (9) Laboratory of Molecular Biology and Genetics at Center of Agricultural, Environmental and Biological Sciences (CCAAB-UFRB).

Mailing address

Ricardo David Couto, PharmD, PhD, Clinical Biochemistry Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Bahia/UFBA, Salvador, Bahia, Brazil

Rua Barão de Jeremoabo, SN, Ondina

CEP – 40170-115

Salvador, Bahia, Brazil

E-mail - rdc@ufba.br; Phone/Fax. (+5571) 3283-6952/8095

ABSTRACT

BACKGROUND: End stage renal disease (ESRD) is associated with dyslipidemia and premature atherosclerosis. The study evaluates the effect of hemodialysis (HD) on HDL remodeling between pre- and post-HD.

DESIGN AND METHODS: 50 ESRD male patients, undergoing HD at Ana Neri Hospital, Brazil, by 03 months, with low-flow polysulfone dialyzing-membrane, bicarbonate and unfractionated-heparin. Phospholipid-incorporation was determined by PL¹⁴C scintillation-counting in serum HDL fraction, expressed as % PL¹⁴C/mL/hour. PON 1-activity was measured using Tris-HCl buffer containing paraoxon, and 7 μ L of serum. Cardiovascular risk ratios and atherogenic index of plasma (AIP) were calculated.

RESULTS: Total cholesterol, HDL-C and non-HDL-C increased in post-HD on all age groups, but without triglycerides (TG) changes. TG/HDL-C decreased in 30-39 and 40-49 in post-HD ($p < 0.05$). LDL-C/apoB increased in > 60 after HD ($p < 0.05$). HDL-C/apo AI increased in 40-49 ($p < 0.05$) and > 60 ($p < 0.01$). On the other hand, non-HDL-C/HDL-C reduced in 40-49 and > 60 in post-HD ($p < 0.05$). The correlation between % PL¹⁴C-incorporation and non-HDL-C/HDL-C was negative in 30-39, both in pre-HD ($r = -0.90$; $p = 0.002$) and post-HD ($r = -0.78$; $p = 0.022$). Correlation between PON-1 and % PL¹⁴C-incorporation was positive in > 60 , both in pre- ($r = 0.63$; $p = 0.029$) and post-HD ($r = 0.65$; $p = 0.022$). PON-1 activity increased in pre- (59 ± 30) and post-HD (73 ± 38) in 50-59 ($p < 0.05$). The % PL¹⁴C-incorporation reduced in > 60 years ($p < 0.05$) when compared pre- and post-HD.

CONCLUSIONS: In the evaluated casuistic, ESRD patients undergoing HD showed important changes in lipid profile, PON-1 activity, cardiac risk ratios and HDL remodeling. These results demonstrate the influence of HD on lipid metabolism of ESRD patients.

Keywords: hemodialysis, dyslipidemia, cardiovascular risk bioindices, PLTP and PON-1.

1. Introduction

Cardiovascular disease is the major cause death in end stage renal disease (ESRD) patients, undergoing renal replacement therapy, such hemodialysis (HD) [1, 2]. These individuals show various metabolic abnormalities that contribute to development of advanced atherosclerosis [3]. Besides traditional atherogenic risk factors, few biomarkers have been postulated to be relevant cardiovascular risk markers in ESRD, including aspects of malnutrition, anemia, hypoalbuminemia, elevated fibrinogen levels, oxidative stress and inflammation [4].

Uremic dyslipidemia is a common complication in patients with chronic kidney disease, which may persist or worsen during renal replacement therapy [5]. Especially in HD, lipid metabolism disturbances are characterized by reduced levels of HDL-C, apolipoprotein AI (apoAI) and hypertriglyceridemia [6]. Some studies have shown that factors inherent to dialysis technique may alter lipid profile, for example, the type of dialyzer membrane (cellulose-triacetate or polysulfone) [7] and the type of dialyzer buffer (bicarbonate-based or acetate) [8, 9].

High density lipoprotein (HDL) acts in reverse cholesterol transport, but to perform its atheroprotective functions, HDL needs to maintain stability (structure and composition). There are some key enzymes that participate in HDL and triglyceride-rich lipoproteins metabolism, such as cholesterol esters transfer protein (CETP) and phospholipid transfer protein (PLTP) [10]. The role of PLTP in HDL remodeling is influenced by particle protein composition and triglycerides concentration [11]. Some experimental trials have demonstrated the PLTP pro-atherogenic role [12, 13], and in humans PLTP is associated with cardiovascular complications [14]. HDL exerts multiple atheroprotective functions, among them antioxidant activity, mainly performed by paraoxonase (PON-1), by hydrolysis of phospholipids and cholesterol ester hydroperoxides [15]. Patients with ESRD, shows PON-1 reduced activity [16].

By the fact that patients maintained on HD have been exposed to many heterogeneous factors that result in quantitative and qualitative lipid abnormalities, the aim of this study was to investigate possible changes in lipid profile, cardiovascular risk indices and enzymes associated with HDL in patients on HD.

2. Materials and methods

2.1 Subjects

A transversal study was conducted with 50 ESRD male patients, selected by convenience, undergoing HD at Ana Neri Hospital in Salvador, Brazil. All individuals were on HD for at least 03 months, into a protocol of three sessions of 3-4 hours per week, with a synthetic dialyzing membrane (polysulfone) of low flow, basic dialyzing solution (bicarbonate) and heparin unfractionated (Hemofol ®). The causes of ESRD in these patients were: hypertension (n = 9), diabetic nephropathy (n = 7), HIV nephropathy (n = 1), chronic pyelonephritis (n = 1), polycystic kidney disease (n = 1) and unknown (n = 30). Patient's clinical characteristics are shown in Table 1. Study participants were stratified by age as 30-39 (n = 10), 40-49 (n = 14), 50-59 (n = 11) and > 60 years (n = 15), according to V Brazilian Guidelines of Dyslipidemia and Atherosclerosis Prevention criteria [17]. The study was approved by the research ethic committee from Federal University of Bahia, Brazil.

2.2 Laboratory methods

Laboratory tests were performed on serum samples taken-up before and after the dialysis session. Concentrations of total cholesterol (TC), LDL-C, HDL-C, triglycerides (TG), total protein and albumin were determined by enzymatic methods (endpoint and kinetic reactions). Determinations of LDL-C were performed by homogeneous direct method (LDL-C direct BioSystems ®, Spain). Two equipments were used, a semi-automated StarDust MC15 (Diasys, Germany) and automated LabMax 240 Clinical Chemistry Analyzer (LABTEST,

Brazil). Concentrations of apoAI and apo B were determined by immunonephelometry through a full automated analyzer, IMMAGE ® (BeckmanCoulter, USA).

2.3 Incorporation of phospholipid in HDL

Incorporation of phospholipids was determined by scintillation-counting of carbon-¹⁴ labeled-phospholipids (PL¹⁴C) in HDL recovered fraction. The PL-incorporation method was developed from exogenous substrate method [18]. For each sample, 1.0 (one) microliter of PL¹⁴C (0,4µCi/mL) were added to 500 microliters of serum, homogenized by vortexing, and immediately placed into an ice bath (0 – 4°C) for one hour, to establish a balance between endogenous (PL) and added PL¹⁴C. After that time, samples were incubated for one hour at 37°C under constant agitation. Afterwards samples were cooled in an ice bath to halt reaction. So, 250 microliters of labeled serum were separated for background reading. In another 250 microliters of labeled samples, were added 250 microliters of precipitating reagent previously prepared with 0.2% dextran-sulfate and 3.0 Molar MgCl₂, v/v to precipitate lipoproteins containing apoB. Subsequently samples were centrifuged under refrigeration for 10 minutes at 3000 rpm and supernatant containing HDL was separated for radioactivity determination. Hidex Chamaleon, a liquid scintillation multilabel detection platform (Turku, Finland) was used to counting detection. To evaluate repeatability and avoid light scattered interferences, samples were shared into five aliquots and pipetted into interspersed 96 wells ELISA plates. In each well were added aliquots of serum and scintillation solution, Ultima Gold (High flash-point LSC-cocktail for aqueous and non-aqueous samples - PerkinElmer, Inc., Waltham, USA), 50 and 250 microliters, respectively. HDL PL-incorporation was expressed as percentage of PL¹⁴C/counts-per-minute/hour.

2.4 PON-1 activity

Paraoxonase activity was measured according to Senti et al. [19]. 140 µL of 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, containing CaCl₂, 2 mmol/L, and paraoxon, 1.1 mmol/L, (Sigma Chemical Co.) and

7 μ L of serum were used. Samples were distributed in duplicate into a 96 well plate. Readings were done at 405nm and 37 °C, with a Microplate Reader (Benchmark, Bio-Rad). For activity calculation, six readings were made at intervals of one minute each, and results were obtained by multiplying average variation of absorbance factor.

2.5 Bioindices

The following lipid parameters were calculated: non-HDL-C (=TC-HDL-C), TG/HDL-C, apoB/apoAI, TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, HDL-C/apoAI, LDL-C/apoB, non-HDL-C/HDL-C and atherogenic index of plasma (AIP) = \log (TG/HDL-C). As TG/HDL-C did not obtain a normal distribution, for all subgroups was used the \log (TG/HDL-C) to confirm the results. For AIP, patients were classified according to three risk categories conventionally used < 0,11 (low), 0,11 to 0,21 (intermediate) and > 0,21 (high) [20].

2.6 Statistical analysis

A descriptive analysis was performed to obtain summary measures, and normality test (Pearson Omnibus D' Agostotino) was used to access data distribution. To data with normal distribution were used parametric tests, but if data doesn't attain normal distribution, non-parametric tests were used. To inferential analyses, data were considered significant when $p < 0.05$ for a confidence interval of 95%. Preceding any statistical analysis, Grubb test was performed to outlier detection. Data analyses was conducted at GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

The Pearson's linear correlation coefficient was applied to assess the correlation between two different parameters in the same group when data shows less dispersion around the line (homoscedasticity) and for those that showed heterocedasticity was used Spearman's linear correlation coefficient.

3. Results

Our data showed significant increases on TC, HDL-C and non-HDL-C level in all age groups after HD. No significant differences were observed on TG levels when compared to pre- and post-HD (table 1).

Apo AI was increased after HD in the age groups 30-39 ($p < 0.05$), 40-49 ($p < 0.05$) and 50-59 years ($p < 0.01$). Apo B was also increased in 40-49 ($p < 0.01$), 50-59 ($p < 0.001$) and > 60 years ($p < 0.05$), after HD. However apo B/apo AI ratio shows no significant difference between tested groups. TG/HDL-C was reduced in age groups 30-39 and 40-49 years ($p < 0.05$), when compared pre- and post-HD. Similar results were obtained for AIP. The LDL-C/apoB ratio increases in age groups > 60 years ($p < 0.05$). The cholesterol quantity per HDL particle, estimated by HDL-C/apo AI index, was increased in age groups 40-49 ($p < 0.05$) and > 60 years ($p < 0.01$). The reduction of non-HDL-C/HDL-C ratio was also observed in age groups 40-49 and > 60 years ($p < 0.05$) (table 2).

There was a negative linear correlation between % incorporation of PL¹⁴C and non-HDL-C/HDL-C in age group 30-39 years (pre-, $r = -0.90$, $p = 0.002$, and post-HD, $r = -0.78$, $p = 0.022$, Pearson) and a positive correlation between PON-1 and % incorporation of PL¹⁴C in age group > 60 years (pre-HD, $r = 0.63$, $p = 0.029$, post-HD, $r = 0.65$, $p = 0.022$). A positive correlation between PON-1 and LDL-C/apoB was also observed in age group > 60 years (pre-, $r = 0.62$, $p = 0.032$, and post-HD, $r = 0.75$, $p = 0.003$) (table 3).

Figure 1 shows the paraoxonase activity in different analyzed age groups. In age group 50-59 years Pre - (59 ± 30) and Post - HD (73 ± 38), values are shown as mean \pm standard deviation. There was increased paraoxonase activity in post-HD ($p < 0.05$). In the other groups were no differences. Was observed a significant reduction of % phospholipid incorporation in post-HD ($p < 0.05$) in age group > 60 years, Pre- (12 ± 3) and post - HD (10 ± 3), values are shown as mean \pm standard deviation (Fig. 2).

3. Discussion

PON-1 activity has been cited as the major antioxidant component of HDL [10]. PON-1 activity reduction has been noticed on HD patients, and can be a contributing factor of atherosclerosis development [21]. PON-1 is cited to be present at various steps of systemic oxidative stress, both in animal and human models [22]. In this study was a significant PON-1 activity increase (50-59 years, $p < 0.05$) (Fig. 1). Gugliucci et al. [3] in a similar study also found a significant PON-1 activity increase ($p < 0.001$) in post-HD. However, there was a negative correlation between PON-1 activity and serum concentrations of urea and creatinine, although Gugliucci et al. [3] observed inhibition/reduction of PON-1 activity, when compare paraoxonase (from fresh control serum) incubates with ESRD patients ultrafiltrate or control serum. According Gugliucci and colleagues, these results suggests other type of mechanism related to uremic toxins retention that causes the impairment of HDL PON-1 antioxidant function [3].

However, these results were confronted by Rajković et al. [21] who found reduced PON-1 activity in patients with ESRD. The authors reproduced in vitro experiments performed by Gugliucci et al. [3] to test the hypothesis if uremic toxins possibly influences PON-1 activity in patients with ESRD, but results showed that high serum concentrations of urea, creatinine and uric acid as well serum ultrafiltered (consisting of molecules with MW less than 10,000 Da) in patients on HD had no impact on PON-1 activity. Based on above results, it can be concluded that molecules retained in hemodialyzed patients serum that have relative molecular mass lower than 10.000 Da did not have PON-1 activity inhibitory effect [21].

PON-1 activity can be influenced by environmental factors and polymorphisms [23, 24] which could also explain the different results among studies. In that perspective, the present study shows that HD can interfere with HDL antioxidant potential, therefore, it seems to modify PON-1 activity in patients with ESRD on post-HD.

HDL atheroprotective efficiency depends on its structure and composition maintain. PLTP is an transfer protein which has a central role in HDL metabolism due to its phospholipid transfer activity among lipoproteins [10]. In despite of that, some studies suggest that pro-inflammatory properties of PLTP may be associated with pro-atherosclerotic events [25, 26]. PON-1 and PLTP are constitutive enzymes/transfer proteins of HDL particle. In the present study, we found a positive linear correlation between PL14C incorporation and PON-1 activity in age group > 60 years (Pre-, $r = 0.63$, $p = 0.029$, Pearson) and (post-HD, $r = 0.65$, $p = 0.022$, Pearson), table 4, suggesting that both paraoxonase activity and HDL phospholipid transfer protein increases proportionally. PON-1 is an enzyme that is linked to HDL apo AI [3], thereby studying patients undergoing HD, Schlitt et al. [1] found a positive correlation between PLTP activity and HDL-C, and Cheung et al. [27] observed a positive correlation between PLTP and apo AI.

Our results show a significant reduction in percentage of PL14C incorporation in post-HD age groups > 60 years (Fig. 2), indicating reduced PLTP activity. Schlitt et al. [1] observed in a study with 68 ESRD patients and 68 control that PLTP activity was almost twice of control group ($p < 0.001$), based on information from previous studies that describes directly association between increased PLTP activity and cardiovascular events. The authors investigate PLTP activity associated with inflammatory markers and found a negative linear correlation between PLTP activity and serum C-reactive protein ($r = -0.057$, $p = 0.644$), however, no linear correlation between PLTP activity and leukocytes counting were found. Similar results were obtained by Cheung et al.[28] in which authors found no association between PLTP activity and inflammatory markers, C-reactive protein, amyloid A (SAA) and IL-6 in coronary artery disease (CAD) patients. Pahl et al. [29] found no significant difference between PLTP activity and its plasmatic mass in patients with ESRD when compared to control group, and also found no significant correlation between PLTP activity

and inflammatory cytokines (IL-6, IL-8 and TNF- α). According to these authors, although systemic inflammation predominates in patients maintained on HD, such findings exclude the relationship between PLTP and inflammatory response in individuals with ESRD.

Several studies have reported that apolipoproteins are effective atherogenic markers. Apo AI is used as an antiatherogenic and apo B as an atherogenic marker, apo B/apo AI ratio reflects the balance between potentially atherogenic cholesterol-rich apo B-containing particles and antiatherogenic apo A-I rich particles, which is proposed as an integrated measurement of cardiac risk related to lipoprotein profile [30, 31].

According to Huang et al. [30] patients with CAD using statins had apo B/apo AI ratio positively associated with clinical events, and the same was not observed for LDL-C/HDL-C index. In the present study, there was an apo AI serum concentration increase in post-HD with significant differences among age groups 30-39 ($p < 0.05$), 40-49 ($p < 0.05$), and 50-59 years ($p < 0.01$) Table 3. The serum concentration of apo B also increase in post - HD with a significant difference among age groups 40-49 ($p < 0.01$), 50-59 ($p < 0.001$) and > 60 years ($p < 0.05$), Table 3. However, we didn't find apo B/apo AI ratio significant differences among all age groups (Table 3). Our study demonstrates that HD elevates serum levels of apo AI and apo B, however, the increase does not appear relevant, since when we investigate apo B/apo AI ratio there was no difference, or better, it remained constant.

The European Cardiology Society clinical guide and the European Atherosclerosis Society recommends that non-HDL-C index is the best estimate of risk when compared to LDL-C, particularly for hypertriglyceridemic patients with ESRD [32].

Furthermore, although apo B can be directly measured, calculation of non-HDL-C is more practical, reliable and lower cost, and have being accepted as a surrogate marker of apo B in clinical practice [33]. In spite of that, use of lipid ratios in hypertriglyceridemia, from knowledge of a diabetes prospective study carried out in UK, non-HDL-C/HDL-C ratio is a

better risk marker than the isolated analysis of non-HDL-C to predict development of CHD in patients with type 2 diabetes [34]. In another observational study using patients with type 2 diabetes to assess the best lipid parameter as a predictor of CAD risk in type 2 diabetes, it was shown that non-HDL-C/HDL-C was the best risk marker for CAD when compared to LDL-C, HDL-C, non-HDL-C [35]. In our study was a significant increase in serum concentration of non-HDL-C in all age groups in post-HD (Table 2). However, were also significant increases of serum HDL-C concentration in all age groups in post-HD (Table 2). The non-HDL-C/HDL-C index shows significant decrease in age groups 40-49 ($p < 0.05$) and > 60 years in post-HD ($p < 0.05$) (Table 3). Recently Kimak et al. [36] demonstrated a HDL-C/non-HDL-C ratio reduction in patients on HD, when compared to control group. Similarly, Cabarkapa et al. [20] used a group of patients on HD ($n = 46$), patients with CKD stage II, III and IV ($n = 50$) and 48 control to assess lipid profile and bio-indices in individuals with CKD. The authors observed that non-HDL-C/HDL-C ratio was significantly higher in HD group ($p < 0.05$) when compared to the other groups.

In spite of the correlation analysis, a negative linear correlation was obtained between PL14C incorporation and non-HDL-C/HDL-C ratio in age group 30-39 years ($r = -0.0903$, $p = 0.002$, Pre -, and $r = -0.781$, $p = 0.022$, post-HD; Pearson), that is, the higher the PLTP activity higher the concentration of HDL-C (Table 4) will be. An in vitro study demonstrates the involvement of PLTP in HDL remodeling after incubation of homogeneous and spherical HDL populations containing apo AI, cholesterol esters and triglycerides, with PLTP. The larger diameter HDL particle's formation was seemed only after 3h of experiment [37]. These results were confirmed by Van Haperen et al.[38] after developing a murine model of transgenic mice (overexpression of human PLTP) and found that incubation of plasma from transgenic animals at 37°C showed increased by 2 to 3 times pre- β -HDL formation when compared to wild animals. In contrast, transgenic animal's plasma levels of HDL-C were

reduced by 20-30% when compared with wild type mice. However, studies with PLTP knockout mice have shown that enzyme activity deficiency causes reduction in serum concentration of HDL-C [39, 40]. So far the evidence has shown that changes in serum levels of PLTP are directly related not only to HDL remodeling, but also to changes in HDL-C serum levels.

Following metabolic disturbance of lipid metabolism in HD patients, the uremic dyslipidemia is also characterized by predominance of small density LDL (sdLDL) [41]. Studies have cited the association of sdLDL with increased risk of myocardial infarction [42, 43]. In our study was no significant difference in serum levels of triglyceride between pre- and post-HD, however, was observed a significant increase of HDL-C in post-HD in all studied age groups, which led to a reduction of TG/HDL-C ratio in 30-39 ($p < 0.05$) and 40-49 years ($p < 0.05$) age groups, table 3.

According to Da Luz et al. [44], TG/HDL-C ratio classifies LDL into two different phenotypes: if above 3.8, there's a predominance of sdLDL (79% phenotype B) and if under that, there's a phenotype A predominance (81%) [45]. Despite reduction of TG/HDL-C ratio among some post-HD age groups, pre- and post-HD average analysis showed that was no change in LDL phenotype (sdLDL). Likewise, when we used classification proposed by Tani et al. [46], in which results under 1.2 for the LDL-C/apo B ratio (cholesterol concentration per LDL particle) indicates the existence of sdLDL. In our study LDL phenotype was different in age group > 60 years (pre- $0,9 \pm 0,3$ and post-HD $1,0 \pm 0,3$; $p < 0,05$). Although significant differences were observed between pre- and post-HD for age group > 60 years, the other evaluated age groups, by LDL-C/apoB ratio, did not show LDL phenotype changes. The Atherogenic Index of Plasma (AIP) has been cited recently as a risk marker for atherogenic disease since it indirectly indicates sdLDL in HD patients [20, 47, 48]. Our study showed a significant reduction of AIP in age groups 30-39 and 40-49 year ($p < 0.05$). In the latter, it is

important to point out that, according to classification proposed by Holmes et al. [49], was a change from high (pre-, 0.36 ± 0.37) to low risk (post-HD; 0.16 ± 0.39). On the other hand, Cabarkapa et al. [20] found a significant increase in AIP for HD patients when compared to CKD under conservative treatment ($p < 0.05$) and health individuals ($p < 0.001$). The use of TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C indexes are more reliable for assessing of CVD risk than a lipid profile comprised of isolated parameters [50]. There was a reduction in TC/HDL-C ratio with a significant difference in all age groups in post-HD, Table 3. Interestingly, in age groups 40-49 and > 60 years, patients changed from high to low risk category. According to Castelli et al. [51] male patients with TC/HDL-C index values greater than 5.1 is to be considered in a high coronary risk classification. Some authors have questioned the influence of dialysate buffer on serum levels of HDL-C. Jung et al. [8] found an increase in serum HDL-C in patients on HD using bicarbonate-dialysate buffer when compared with acetate group, which results were confirmed in a similar study [9]. Based on this finding the authors justified the improvement in "atherogenic index" (TC/HDL-C) in patients undergoing HD (bicarbonate) compared to those in HD (acetate). Recent data showed that TC/HDL-C is increased in patients (CKD) held in HD compared to healthy population [36].

The plasmatic HDL is composed of heterogenous particle size lipoprotein populations which differ by their structures, compositions and biological functions. HDL heterogeneity results in different apolipoprotein and particle lipid content [52]. HDL-C/apo AI ratio was increased in post-HD age groups 40-49 ($p < 0.05$) and > 60 years ($p < 0.01$), Table 3. These findings lead to an improvement of cholesterol load in HDL that may suggest particle size increases after HD [53]. Fernandez et al. [54] showed that HDL-C concentration was directly correlated to HDL diameter increases. According to Vekic et al. [55] larger lipoprotein diameter subclasses (HDL2a and HDL2b) are negatively correlated with CVD, by contrast, smaller ones (HDL3a , and HDL3b HDL3c) are positively correlated.

In conclusion, the study demonstrated that lipid profile and cardiac risk ratios were altered during HD. The hemodialysis seems to influence the HDL remodeling by altering the ability to incorporate phospholipids and reduced PON-1 activity. As we know that uremic dyslipidemia behave differently from the common ones, new biomarkers to evaluate HDL remodeling should be used for patients maintained on hemodialysis.

References

1. Schlitt A, Heine GH, Jiang XC, Messow M, Blankenberg S, Rupprecht HJ, et al. Phospholipid transfer protein in hemodialysis patients. *Am J Nephrol*. 2007;27(2):138-43.
2. Shoji T, Abe T, Matsuo H, Egusa G, Yamasaki Y, Kashihara N, et al. Chronic kidney disease, dyslipidemia, and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2011;19(4):299-315.
3. Gugliucci A, Mehlhaff K, Kinugasa E, Ogata H, Hermo R, Schulze J, et al. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance. *Clin Chim Acta*. 2007 Feb;377(1-2):213-20.
4. Yamamoto S, Kon V. Mechanisms for increased cardiovascular disease in chronic kidney dysfunction. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2009;18(3):181-8.
5. Mitwalli AH, Alam AA, Al Wakeel JS, Isnani AC. Dyslipidemia in dialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2011 Jul;22(4):689-94.
6. Chmielewski M, Carrero JJ, Nordfors L, Lindholm B, Stenvinkel P. Lipid disorders in chronic kidney disease: reverse epidemiology and therapeutic approach. *J Nephrol*. 2008 Sep-Oct;21(5):635-44.
7. Lacquaniti A, Bolignano D, Donato V, Bono C, Fazio MR, Buemi M. Alterations of lipid metabolism in chronic nephropathies: mechanisms, diagnosis and treatment. *Kidney Blood Press Res*. 2010;33(2):100-10.
8. Jung K, Scheifler A, Schulze BD, Scholz M. Lower serum high-density lipoprotein-cholesterol concentration in patients undergoing maintenance hemodialysis with acetate than with bicarbonate. *Am J Kidney Dis*. 1995 Apr;25(4):584-8.
9. Abo-Zenah H, Sabry A, Farouk A, Abdelhalim N, El-Sayed K, Sobh M. The impact of haemodialysis-associated variables on lipid profile in Egyptian haemodialysis population. *Int Urol Nephrol*. 2007;39(2):609-18.
10. Cacciagi LD, Gonzalez AI, Gomez Rosso L, Merono T, De Marziani G, Elbert A, et al. HDL-associated enzymes and proteins in hemodialysis patients. *Clin Biochem*. 2012 Feb;45(3):243-8.
11. Oka T, Kujiraoka T, Ito M, Egashira T, Takahashi S, Nanjee MN, et al. Distribution of phospholipid transfer protein in human plasma: presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive. *J Lipid Res*. 2000 Oct;41(10):1651-7.

12. Masson D, Deckert V, Gautier T, Klein A, Desrumaux C, Viglietta C, et al. Worsening of diet-induced atherosclerosis in a new model of transgenic rabbit expressing the human plasma phospholipid transfer protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Apr;31(4):766-74.
13. van Haperen R, van Tol A, van Gent T, Scheek L, Visser P, van der Kamp A, et al. Increased risk of atherosclerosis by elevated plasma levels of phospholipid transfer protein. *J Biol Chem.* 2002 Dec 13;277(50):48938-43.
14. Attia N, Domingo N, Lorec AM, Nakbi A, Hammami S, Ben Hamda K, et al. Reverse modulation of the HDL anionic peptide factor and phospholipid transfer protein activity in coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 2009 Jun;42(9):845-51.
15. Superko HR. Cardiovascular event risk: high-density lipoprotein and paraoxonase. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Sep 29;54(14):1246-8.
16. Gugliucci A, Kinugasa E, Kotani K, Caccavello R, Kimura S. Serum paraoxonase 1 (PON1) lactonase activity is lower in end-stage renal disease patients than in healthy control subjects and increases after hemodialysis. *Clin Chem Lab Med.* 2011 Jan;49(1):61-7.
17. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2013;101:1-20.
18. Channon KM, Clegg RJ, Bhatnagar D, Ishola M, Arrol S, Durrington PN. Investigation of lipid transfer in human serum leading to the development of an isotopic method for the determination of endogenous cholesterol esterification and transfer. *Atherosclerosis.* 1990 Jan;80(3):217-26.
19. Senti M, Tomas M, Fito M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, et al. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Nov;88(11):5422-6.
20. Cabarkapa V, Djeric M, Stosic Z, Sakac V, Lozanov-Crvenkovic Z, Vuckovic B. Evaluation of lipid parameters and bioindices in patients with different stages of chronic renal failure. *Vojnosanitetski pregled.* 2012;69(11):961-6.
21. Rajkovic MG, Rumora L, Juretic D, Grubisic TZ, Flegar-Mestric Z, Vrkic N, et al. Effect of non-genetic factors on paraoxonase 1 activity in patients undergoing hemodialysis. *Clin Biochem.* 2010 Dec;43(18):1375-80.
22. Kennedy DJ, Tang WH, Fan Y, Wu Y, Mann S, Pepoy M, et al. Diminished antioxidant activity of high-density lipoprotein-associated proteins in chronic kidney disease. *J Am Heart Assoc.* 2013 Apr;2(2):e000104.
23. Camps J, Garcia-Heredia A, Rull A, Alonso-Villaverde C, Aragonés G, Beltran-Debon R, et al. PPARs in Regulation of Paraoxonases: Control of Oxidative Stress and Inflammation Pathways. *PPAR Res.* 2012;2012:616371.
24. Gugliucci A, Kotani K, Kimura S. Paraoxonase 1 in chronic kidney failure. *J Lipids.* 2012;2012:726048.
25. Yan D, Navab M, Bruce C, Fogelman AM, Jiang XC. PLTP deficiency improves the anti-inflammatory properties of HDL and reduces the ability of LDL to induce monocyte chemotactic activity. *J Lipid Res.* 2004 Oct;45(10):1852-8.
26. Schlitt A, Liu J, Yan D, Mondragon-Escorpizo M, Norin AJ, Jiang XC. Anti-inflammatory effects of phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency in mice. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Apr 15;1733(2-3):187-91.

27. Cheung MC, Wolfbauer G, Brown BG, Albers JJ. Relationship between plasma phospholipid transfer protein activity and HDL subclasses among patients with low HDL and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 1999 Jan;142(1):201-5.
28. Cheung MC, Brown BG, Marino Larsen EK, Frutkin AD, O'Brien KD, Albers JJ. Phospholipid transfer protein activity is associated with inflammatory markers in patients with cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Jan;1762(1):131-7.
29. Pahl MV, Ni Z, Sepassi L, Moradi H, Vaziri ND. Plasma phospholipid transfer protein, cholesteryl ester transfer protein and lecithin:cholesterol acyltransferase in end-stage renal disease (ESRD). *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009;24(8):2541-6.
30. Huang F, Yang Z, Xu B, Bi Y, Xu M, Xu Y, et al. Both serum apolipoprotein B and the apolipoprotein B/apolipoprotein A-I ratio are associated with carotid intima-media thickness. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e54628.
31. Walldius G, Jungner I, Aastveit AH, Holme I, Furberg CD, Sniderman AD. The apoB/apoA-I ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(12):1355-63.
32. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*. 2011 Jul;32(14):1769-818.
33. Peters AL. Clinical Relevance of Non-HDL Cholesterol in Patients With Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2008;26(1):3(5).
34. Holman RR, Coleman RL, Shine BS, Stevens RJ. Non-HDL cholesterol is less informative than the total-to-HDL cholesterol ratio in predicting cardiovascular risk in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005 Jul;28(7):1796-7.
35. Eliasson B, Cederholm J, Eeg-Olofsson K, Svensson AM, Zethelius B, Gudbjornsdottir S. Clinical usefulness of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in type 2 diabetes: a report from the Swedish National Diabetes Register. *Diabetes Care*. 2011 Sep;34(9):2095-100.
36. Kimak E, Halabis M, Baranowicz-Gaszczyk I, Solski J, Ksiazek A. Association between moderately oxidized low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclass distribution in hemodialyzed and post-renal transplant patients. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011 May;12(5):365-71.
37. Settasatian N, Duong M, Curtiss LK, Ehnholm C, Jauhiainen M, Huuskonen J, et al. The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem*. 2001 Jul 20;276(29):26898-905.
38. van Haperen R, van Tol A, Vermeulen P, Jauhiainen M, van Gent T, van den Berg P, et al. Human plasma phospholipid transfer protein increases the antiatherogenic potential of high density lipoproteins in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Apr;20(4):1082-8.
39. Yazdanyar A, Yeang C, Jiang X-C. Role of Phospholipid Transfer Protein in High-Density Lipoprotein– Mediated Reverse Cholesterol Transport. *Current Atherosclerosis Reports*. 2011;13(3):242-8.

40. Dullaart RP, van Tol A, Dallinga-Thie GM. Phospholipid transfer protein, an emerging cardiometabolic risk marker: is it time to intervene? *Atherosclerosis*. 2013 May;228(1):38-41.
41. Tsimihodimos V, Mitrogianni Z, Elisaf M. Dyslipidemia associated with chronic kidney disease. *Open Cardiovasc Med J*. 2011;5:41-8.
42. Tsunoda F, Koba S, Hirano T, Ban Y, Iso Y, Suzuki H, et al. Association between small dense low-density lipoprotein and postprandial accumulation of triglyceride-rich remnant-like particles in normotriglyceridemic patients with myocardial infarction. *Circ J*. 2004 Dec;68(12):1165-72.
43. Koba S, Hirano T, Murayama S, Kotani T, Tsunoda F, Iso Y, et al. Small dense LDL phenotype is associated with postprandial increases of large VLDL and remnant-like particles in patients with acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2003 Sep;170(1):131-40.
44. Da Luz PL, Favarato D, Faria-Neto Junior JR, Lemos P, Chagas ACP. High ratio of triglycerides to hdl-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics*. 2008;63(4).
45. Rizzo M, Barbagallo CM, Severino M, Polizzi F, Onorato F, Noto D, et al. Low-density-lipoprotein peak particle size in a Mediterranean population. *Eur J Clin Invest*. 2003 Feb;33(2):126-33.
46. Tani S, Saito Y, Anazawa T, Kawamata H, Furuya S, Takahashi H, et al. Low-density lipoprotein cholesterol/apolipoprotein B ratio may be a useful index that differs in statin-treated patients with and without coronary artery disease: a case control study. *Int Heart J*. 2011;52(6):343-7.
47. Erdur MF, Tonbul HZ, Ozbiner H, Ozcicek A, Ozcicek F, Akbas EM, et al. The relationship between atherogenic index of plasma and epicardial adipose tissue in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Ren Fail*. 2013 Oct;35(9):1193-8.
48. Yildiz G, Duman A, Aydin H, Yilmaz A, Hur E, Magden K, et al. Evaluation of association between atherogenic index of plasma and intima-media thickness of the carotid artery for subclinic atherosclerosis in patients on maintenance hemodialysis. *Hemodial Int*. 2013 Jul;17(3):397-405.
49. Holmes DT, Frohlich J, Buhr KA. The concept of precision extended to the atherogenic index of plasma. *Clin Biochem*. 2008 May;41(7-8):631-5.
50. Yang D, Liu X, Xiang M. The correlation between lipids ratio and degree of coronary artery stenosis. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2011 Jun 1;18(2):53-6.
51. Castelli WP, Abbott RD, McNamara PM. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation*. 1983 Apr;67(4):730-4.
52. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med*. 2011 Oct;17(10):594-603.
53. Abbasi A, Corpeleijn E, Gansevoort RT, Gans RO, Hillege HL, Stolck RP, et al. Role of HDL cholesterol and estimates of HDL particle composition in future development of type 2 diabetes in the general population: the PREVEND study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Aug;98(8):E1352-9.
54. Fernandez ML, Jones JJ, Ackerman D, Barona J, Calle M, Comperatore MV, et al. Low HDL cholesterol is associated with increased atherogenic lipoproteins and insulin resistance in women classified with metabolic syndrome. *Nutr Res Pract*. 2010 Dec;4(6):492-8.

55. Vekic J, Kotur-Stevuljevic J, Jelic-Ivanovic Z, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Topic A, et al. Association of oxidative stress and PON1 with LDL and HDL particle size in middle-aged subjects. *Eur J Clin Invest.* 2007 Sep;37(9):715-23.

Tables

Table 1. Clinical characteristics of ESRD patients like age, BMI and hemodialysis treatment duration.

Feature	HD Patients (n=50)
Age (years)	57 (32-72)
BMI (Kg/m ²)	23.4±3.4
Duration of Hemodialysis treatment (months)	32.2±20

HD: hemodialysis; n: number; BMI: body mass index. Data are show as mean±sd and median (range) for age.

Table 2. Serum lipoprotein cholesterol, lipids and proteins from ESRD patients age groups in pre and post hemodialysis.

Age group	30 - 39 years		40 - 49 years		50 - 59 years		> 60 years	
	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD
TC (mg/dL)	188 ± 42	209 ± 56 ^a	156 ± 34	190 ± 40 ^c	152 ± 30	176 ± 37 ^c	161 ± 26	185 ± 4 ^b
TG (mg/dL)	274 ± 222	236 ± 243	172 ± 98	158 ± 94	170 ± 85	214 ± 126	148 ± 94	149 ± 112
VLDL-C (mg/dL)	44±25	34 ± 15	36 ± 19	34 ± 18	34 ± 14	43 ± 23	31 ± 18	32 ± 22
LDL-C (mg/dL)	72±26	88±27	68±27	74±39	78±28	85±28	68±17	88±26 ^b
HDL-C (mg/dL)	34 ± 14	41 ± 14 ^b	30 ± 11	42 ± 17 ^c	37 ± 11	43 ± 14 ^a	34 ± 12	45 ± 16 ^c
Non-HDL-C (mg/dL)	156±49	179±64 ^a	126±41	149±48 ^b	111±17	130±30 ^b	125±33	138±47 ^a
Total protein (mg/dL)	7.67 ± 0.7	8.7 ± 1.5 ^b	7.03 ± 0.5	8.72 ± 1.8 ^c	8.38 ± 1.9	9.05 ± 1.3	7.28 ± 0.3	8.2 ± 1 ^b
Albumin (mg/dL)	4,44 ± 0.38	5.01 ± 0.95 ^a	4.28 ± 0.64	5.3 ± 1.26 ^c	4 ± 0.57	4.5 ± 0.56 ^a	4.1 ± 0.35	4.4 ± 0.49 ^c

TC (mg/dL)= Total Cholesterol; TG (mg/dL)= Triglycerides; VLDL-C (mg/dL)= Very Low Density Lipoprotein Cholesterol; LDL-C (mg/dL)= Low Density Lipoprotein Cholesterol; HDL-C (mg/dL)= High Density Lipoprotein Cholesterol; Non-HDL-C (mg/dL)= TC-HDL-C.

Data are show as mean ± sd values. ^a p < 0.05 vs pre HD; ^bp< 0.01vs pre HD; ^cp< 0.001 vs pre HD.

Table 3. Apolipoproteins and laboratory calculated indices from ESRD patient's age groups in pre and post hemodialysis.

	30 - 39 years		40 - 49 years		50 - 59 years		> 60 years	
	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD
Apo AI (mg/dL)	146.4±33.2	165.4±35.4 ^a	141.5±47	161±45.7 ^a	112.5±27.3	133.1±29.7 ^b	151.2±32.7	169.2±47.4
Apo B (mg/dL)	97.6±24	107.3±32.6	78.9±32.5	91.8±39.5 ^b	76 ±20.3	89.6±23.9 ^c	85.6±24.7	93.8±26.7 ^a
Apo B/Apo AI	0.7±0.2	0.7±0.2	0.6±0.2	0.6±0.3	0.7±0.2	0.7±0.3	0.6±0.3	0.6±0.3
TC/HDL-C	6.4±2.9	5.7±2.9 ^b	5.6±2.3	4.9±2.1 ^b	4.5±1.8	4.5±1.9	5.4±3.5	4.6±2.6 ^b
LDL-C/HDL-C	2.3±1.1	2.3±0.8	2.5±1.3	2.2±1.7	2.4±1.3	2.2±1	2.2±1,1	2.2±1
TG/HDL-C	11.3±14.3	8±11.9 ^a	6.8±5.4	4.9±3.9 ^a	5.3±3.7	5.8±4.3	6±8.4	4.2±5.3
AIP	0.5±0.45	0.26±0.45 ^a	0.36±0.37	0.16±0.39 ^a	0.35±0.25	0.32±0.34	0.22±0.41	0.08±0.38
HDL-C/Apo AI	0.23±0.06	0.26±0.07	0.25±0.1	0.32±0.2 ^a	0.31±0.14	0.3±0.09	0.24±0.07	0.28±0.07 ^b
LDL-C/Apo B	0.78±0.3	0.93±0.3	1±0.4	1±0.4	1.1±0.3	1±0.2	0.9±0.3	1±0.3 ^a
Non-HDL-C/HDL-C	4.8±2.3	4.2±1.9	4.6±2.3	4.1±2 ^a	3.4±0.8	3.4±1.3	3.5±1.7	2.9±1.5 ^a

Apo AI (mg/dL)= Apolipoprotein AI; Apo B (mg/dL)= Apolipoprotein B; AIP = log (TG/HDL-C).

Data are mean ± sd values. ^a p < 0.05 vs pre HD; ^bp< 0.01 vs pre HD; ^cp< 0.001 vs pre HD.

Table 4. PL¹⁴C and PON-1 linear correlation coefficient from ESRD patients age groups in pre and post hemodialysis.

PL ¹⁴ C	Non-HDL-C/HDL-C							
	30 - 39 years		40 - 49 years		50 - 59 years		> 60 years	
	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD
r	-0.90	-0.78	-0.07	-0.35	-0.57	-0.03	0.01	-0.04
p	0.002 ^b	0.022 ^a	NS	NS	NS	NS	NS	NS
PON-1	PL ¹⁴ C							
	30 - 39 years		40 - 49 years		50 - 59 years		> 60 years	
	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD	Pre-HD	Post-HD
r	-0.36	0.29	0.13	-0.11	0.17	0.37	0.63	0.65
p	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.029 ^a	0.022 ^a

PL¹⁴C= % PL incorporation/mL/hours; PON-1= Paraoxonase activity.

^a p < 0.05 vs pre HD; ^bp < 0.01 vs pre HD.

6. DISCUSSÃO

Pacientes em hemodiálise possuem alto risco de morte por DCV, pelo fato destes indivíduos desenvolverem aterosclerose de forma precoce que se agrava na presença de distúrbios do metabolismo das lipoproteínas.

Em nosso trabalho houve elevação significativa do CT nos quatro subgrupos estudados após a HD e não houve diferença significativa nos níveis séricos do TG quando comparados o pré-HD e pós-HD, entretanto Gugliucci *et al.* (2007) não verificou diferença significativa nos níveis séricos de CT e TG entre o pré e pós-HD. Assim como Montazerifar *et al.* (2010) que investigaram a possível interferência da HD no perfil lipídico e em níveis séricos de antioxidantes (vitamina A, C e E) também não encontraram diferenças significativas nos níveis séricos de CT e TG entre o pré-HD e pós-HD. Cumpre ressaltar que ambos os estudos realizados por Gugliucci *et al.* (2007) e Montazerifar *et al.* (2010), não demonstraram em suas metodologias se os pacientes estavam em jejum antes e depois da HD, o que dificulta a comparação entre os achados.

Uma das razões para o “papel” antioxidante da HDL é a atividade da PON-1 (CACCIAGIU *et al.*, 2012). A redução da atividade desta enzima tem sido observada nos pacientes em HD e pode ser um dos fatores que contribui para o desenvolvimento da aterosclerose (SAEED *et al.*, 2008; RAJKOVIC *et al.*, 2010; KENNEDY *et al.*, 2013). A PON-1 está bastante envolvida em diversos processos de stress oxidativo sistêmico observado tanto em modelo animal como em humanos (KENNEDY *et al.*, 2013). No nosso estudo houve aumento significativo da atividade da PON-1 (50-59 anos; $p < 0,05$), este resultado corrobora o achado de Gugliucci *et al.* (2007) que em experimento realizado com 22 pacientes com DREF comparou a atividade da PON-1 no período pré e pós-HD e verificaram o aumento significativo ($p < 0,001$) da atividade desta enzima no pós-HD, neste mesmo estudo os autores observaram inibição/redução da atividade da PON-1, quando compararam a atividade da paraoxonase (proveniente de plasma controle fresco) com a incubação de ultrafiltrados plasmáticos de pacientes ESRD ou soro de indivíduos controle. Conforme Gugliucci e colaboradores, estes resultados sugerem a presença de um mecanismo relacionado à retenção de toxinas urêmicas que causa alteração fisiológica na função antioxidante da HDL, mediada pela PON-1.

Todavia, estes resultados foram confrontados por Rajković *et al.* (2010) que encontrou redução da atividade da PON-1 em pacientes com DREF quando comparado com o grupo controle (pacientes saudáveis), os autores reproduziram os experimentos *in vitro* de Gugliucci

et al. (2007) para testar a hipótese da possível influência das toxinas urêmicas sobre a atividade da PON-1 no subgrupo de pacientes com DREF, contudo os resultados demonstraram que as altas concentrações no soro de ureia, creatinina e ácido úrico assim como o ultrafiltrado do soro dos pacientes em HD (constituído de moléculas com massa molecular relativa menor que 10.000 Da) não tiveram impacto sobre a atividade da PON-1. Com base nesses resultados, pode-se descartar que moléculas retidas no soro de pacientes em HD que tem massa molecular relativa inferior a 10.000 Da não possuam efeito inibitório sobre a atividade desta enzima (RAJKOVIC *et al.*, 2010).

A atividade da PON-1 pode ser influenciada por fatores ambientais e polimorfismos (CAMPS *et al.*, 2012; GUGLIUCCI *et al.*, 2012) o que poderia também justificar a diversidade entre os resultados dos diferentes estudos. Neste contexto, o presente trabalho demonstrou que a HD pode interferir no potencial antioxidante da HDL, pois, parece modificar a atividade da PON-1 em pacientes com DREF.

A eficiência da função ateroprotetora da HDL depende da manutenção de sua estrutura e composição. A PLTP é uma das enzimas que possui papel central no metabolismo da HDL, devido a sua atividade de transferência fosfolipídica entre as lipoproteínas, contribuindo para o seus remodelamentos (SCHLITT *et al.*, 2007; CACCIAGIU *et al.*, 2012; ROBINS *et al.*, 2013). Ainda neste aspecto, alguns estudos sugerem que as propriedades pró-inflamatórias da PLTP podem estar associadas aos eventos pró-ateroscleróticos (YAN *et al.*, 2004; SCHLITT *et al.*, 2005). A PON-1 e a PLTP são enzimas associadas a HDL, em nosso trabalho houve correlação positiva entre a incorporação de PL-¹⁴C e atividade da PON-1, no subgrupo > 60 anos, (Pré-HD, $r = 0,63$, $p = 0,029$) e (Pós-HD, $r = 0,65$, $p = 0,022$), sugerindo que existe aumento proporcional de atividade da paraoxonase e da transferência de fosfolipídios para a HDL. A PON-1 é uma enzima que se encontra ligada a apo AI nesta lipoproteína (A. GUGLIUCCI *et al.*, 2007), desse modo, em estudo com pacientes em HD, Schlitt *et al.* (2007) encontrou correlação positiva entre a atividade da PLTP e o HDL-C, assim como Cheung *et al.* (1999) observaram correlação positiva entre PLTP e apo AI.

Nossos resultados demonstraram que houve redução significativa na porcentagem de incorporação de PL-¹⁴C (subgrupo na faixa etária > 60 anos) no período pós-HD, o que indica redução da atividade da PLTP nesta população. Schlitt *et al.* (2007) observaram em estudo com 68 pacientes com DREF e 68 pacientes controles (ditos saudáveis) que a atividade da PLTP foi quase duas vezes maior que no subgrupo controle ($p < 0,001$), com base nas informações de estudos anteriores que descreveram a associação do aumento da atividade da PLTP em eventos cardiovasculares, os autores investigaram a atividade da PLTP associada a

marcadores inflamatórios e verificaram a presença de correlação linear negativa entre a atividade da PLTP e proteína C reativa séricas ($r = -0,057$, $p = 0,644$), além disso, não houve correlação linear entre atividade da PLTP e contagem de leucócitos. Pahl *et al.* (2009) não encontraram diferença significativa entre a atividade e massa plasmática da PLTP em pacientes com DREF quando comparado com o grupo controle (saúdáveis), assim como também não observaram correlação significativa entre a atividade da PLTP e citocinas pró inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- α). De acordo com estes autores tais achados devem ser considerados para avaliação da PLTP como mediadora do metabolismo da HDL e de outras lipoproteínas na DREF.

Diversos estudos tem descrito que as apolipoproteínas são marcadores aterogênicos efetivos. A apo AI é utilizada como indicador antiaterogênico e a apo B como marcador aterogênico, a razão apo B/apo AI reflete o equilíbrio entre partículas de colesterol potencialmente aterogênicas ricas em apo B e as partículas de colesterol antiaterogênicas ricas em apo AI, o qual é proposto como um sistema integrado de medição do risco cardíaco (WALLDIUS *et al.*, 2004; FORTI & DIAMENT, 2007; KIRMIZIS *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2013). De acordo com Huang *et al.* (2013) pacientes com doença arterial coronária em uso de estatina tiveram a razão apo B/apo AI positivamente associada a eventos clínicos, o mesmo não foi observado para o índice LDL-C/HDL-C. Em nossos resultados houve aumento na concentração sérica de apo AI no subgrupo pós-HD com diferença significativa nos subgrupos (30-39 anos; $p < 0,05$), (40-49 anos; $p < 0,05$) e (50-59 anos; $p < 0,01$). Também houve aumento na concentração sérica da apo B no pós - HD com diferença significativa nos subgrupos (40-49 anos; $p < 0,01$), (50-59 anos; $p < 0,001$) e (60 > anos; $p < 0,05$). Entretanto, com relação à razão apo B/apo AI não houve diferença significativa em todos os subgrupos estudados. Nossos resultados demonstraram que a HD eleva os níveis séricos da apo AI e apo B, porém, esse aumento parece não ter relevância, já que quando investigada a relação apo B/apo AI não houve diferença significativa, ou seja, se manteve constante nos subgrupos estudados. O guia clínico da Sociedade Europeia de Cardiologia e Sociedade Europeia de Aterosclerose recomenda que o índice não HDL-C é uma melhor estimativa de risco quando comparado com o LDL-C, em especial, para pacientes com hipertrigliceridemia associada à DRC (REINER *et al.*, 2011). Além disso, apesar de a apo B poder ser medida diretamente, o cálculo do não HDL-C é mais prático, confiável (pode ser utilizado no jejum) e de menor custo, sendo aceito como um marcador substituto da apo B na prática clínica (PETERS, 2008). Neste contexto, com relação ao uso das razões lipídicas na hipertrigliceridemia, um estudo prospectivo sobre diabetes no Reino Unido demonstrou que a razão não-HDL-C/HDL-

C é melhor marcador de risco do que a análise isolada do não HDL-C para prever o desenvolvimento de DAC em pacientes com diabetes tipo 2 (HOLMAN *et al.*, 2005). Em outro estudo observacional utilizando pacientes com diabetes tipo 2 para avaliar o melhor parâmetro lipídico como preditor do risco de desenvolvimento de DAC em diabetes tipo 2, demonstrou-se que a relação não-HDL-C/HDL-C foi melhor marcador de risco para DAC do que LDL-C, HDL-C e não-HDL-C (ELIASSON *et al.*, 2011). No presente trabalho houve aumento na concentração sérica do não-HDL-C em todos os subgrupos estudados (pós-HD) com diferença significativa. Entretanto, também houve elevação da concentração sérica do HDL-C em todos os subgrupos observados (pós-HD) com diferença significativa, o que motivou a análise da relação não-HDL-C/HDL-C verificando-se que houve redução desse índice com diferença significativa nos subgrupos (40-49 anos; $p < 0,05$) e (> 60 anos; $p < 0,05$) pós-HD. Kimak *et al.* (2011) demonstrou redução no índice de risco HDL-C / não HDL-C de pacientes em HD quando comparado com o grupo controle (ditos saudáveis). De modo similar, Cabarkapa *et al.* (2012) para avaliar o perfil lipídico e bioíndices em indivíduos com DRC, utilizou um grupo de pacientes em HD (n=46), pacientes com DRC grau II, III e IV (n=50) e 48 pacientes controle (ditos saudáveis), os autores observaram que a razão não-HDL-C/HDL-C foi significativamente maior no grupo HD ($p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos.

Ainda sobre as análises de correlação, obteve-se correlação linear negativa entre a incorporação de PL-¹⁴C e a razão não-HDL-C/HDL-C, no subgrupo 30-39 anos, ($r = -0,0903$, $p = 0,002$, Pré-HD; $r = -0,781$, $p = 0,022$, Pós-HD; Pearson), ou seja, quanto maior a atividade da PLTP maior a concentração do HDL-C. Estudo *in vitro* demonstrou a participação da PLTP no remodelamento da HDL, após a incubação de populações homogêneas e esféricas da HDL, que continham apo AI, ésteres de colesterol e triglicérides, com PLTP, os autores observaram após 3h a formação de partículas de HDL com maior diâmetro (SETTASATIAN *et al.*, 2001). Resultados similares foram obtidos por Van Haperen *et al.* (2000) após desenvolver modelo murino de camundongos transgênicos (superexpressão da PLTP humana) e verificaram que a incubação do plasma dos animais transgênicos a 37°C revelaram aumento de 2 a 3 vezes a formação de pré β -HDL quando comparado com os animais selvagens, em contrapartida, os animais transgênicos reduziram em 20 a 30% os níveis plasmáticos de HDL-C quando comparado com o grupo controle (camundongos selvagens). Em contrapartida, estudos com camundongos knockout para PLTP têm demonstrado que a deficiência desta enzima provoca redução sérica do HDL-C (YAZDANYAR *et al.*, 2011; DULLAART *et al.*, 2013). Até aqui as evidências têm demonstrado que alterações nos níveis séricos da PLTP

estão diretamente relacionadas, não somente ao remodelamento da HDL, mas também às alterações dos níveis séricos do colesterol desta lipoproteína.

A dislipidemia urêmica também é caracterizada pela predominância de partículas de LDL pequenas e densas (VAZIRI, 2006; TSIMIHODIMOS *et al.*, 2011) e diversos estudos tem citado a associação desta lipoproteína com o aumento do risco de infarto agudo do miocárdio (KOKA *et al.*, 2003; RIZZO *et al.*, 2003; TSUNODA *et al.*, 2004; EMADZADEH *et al.*, 2013). No presente trabalho não houve diferença significativa nos níveis séricos dos triglicérides entre o pré e pós-HD, entretanto, houve aumento significativo do HDL-C no pós-HD em todos os subgrupos estudados o que levou a redução da razão TG/HDL-C nos subgrupos (30-39 anos; $p < 0,05$) e (40-49 anos; $p < 0,05$). Conforme Da Luz *et al.* (2008) este índice classifica a LDL em dois distintos fenótipos: valores acima de 3,8 representam predomínio de LDL pequena e densa (79% de fenótipo B) e valores menores apontam predomínio do fenótipo A (81%) (RIZZO *et al.*, 2003). Apesar da razão TG/HDL-C ter diminuído significativamente no pós-HD em alguns subgrupos, a análise das médias do pré e pós-HD demonstrou que para esta classificação não houve mudança no fenótipo da LDL (pequena e densa). Da mesma maneira, ao utilizarmos a classificação proposta por Tani *et al.* (2011), na qual valores menores ou iguais que 1,2 para a razão LDL-C/apo B (índice que estima a concentração de colesterol por partícula de LDL) indicam a presença de LDL pequena e densa, concluímos que também não houve modificação no fenótipo da LDL para o subgrupo > 60 anos (pré-HD $0,9 \pm 0,3$; pós-HD $1,0 \pm 0,3$; $p < 0,05$). Embora tenham sido observadas diferenças significativas entre pré- e pós-HD para alguns subgrupos utilizando ambas as classificações, não houve alteração no fenótipo predominante presente (LDL pequena e densa).

O índice aterogênico plasmático (IAP) vem aparecendo em recentes publicações como marcador de risco para doença aterogênica por indiretamente indicar a presença de LDL pequena e densa em pacientes mantidos em HD (CABARKAPA *et al.*, 2012; ERDUR *et al.*, 2013; YILDIZ *et al.*, 2013). Em nosso estudo, houve redução do IAP com diferença significativa no pós-HD nos subgrupos 30-39 anos e 40-49 anos ($p < 0,05$, para ambos). Neste último subgrupo é importante destacar que, à luz da classificação de HOLMES *et al.* (2008), houve mudança da classe de alto risco (pré-HD, $0,36 \pm 0,37$) para risco intermediário (pós-HD; $0,16 \pm 0,39$). No entanto, Cabarkapa *et al.* (2012) encontraram aumento significativo desse índice (IAP) nos pacientes em HD com relação ao grupo com DRC em tratamento conservador ($p < 0,05$) e indivíduos saudáveis ($p < 0,001$).

Estudos têm demonstrado que os índices CT/HDL-C e LDL-C/HDL-C são mais confiáveis para avaliar o risco de DCV do que o perfil lipídico composto de parâmetros isolados (KINOSIAN et al., 1994; YANG et al., 2011). Houve redução na relação CT/HDL-C com diferença significativa em todos os subgrupos no pós-HD. É interessante notar que nos subgrupos (40-49 anos) e (>60 anos) os pacientes, inclusive, mudaram de categoria de alto para baixo risco, conforme Castelli *et al.* (1983) para esta razão valores acima de 5,1 considera-se risco coronariano (sexo masculino). Alguns autores tem questionado a influência do tampão dialisato nos níveis séricos do HDL-C dos pacientes em HD, Jung *et al.* (1995) encontrou aumento sérico do HDL-C no grupo de pacientes em HD com tampão dialisato composto de bicarbonato quando comparado com o grupo acetato, resultados que foram confirmados em estudo similar Abo-Zenah *et al.* (2007) com base neste achado os autores justificaram a melhora no “índice aterogênico” (CT/HDL-C) dos pacientes submetidos a HD (bicarbonato) em comparação àqueles em HD (acetato). No entanto, diversos autores mostraram que a relação CT/HDL-C encontra-se aumentada nos pacientes (DRC) mantidos em HD em comparação a população saudável (ELMACHTANI IDRISSEI *et al.*, 2011; KIMAK *et al.*, 2011; ROEHRS *et al.*, 2011).

A HDL plasmática se apresenta em diferentes subpopulações que se diferenciam por suas estruturas, composições e funções biológicas, essa heterogeneidade resulta em diferentes conteúdos de apolipoproteína e lipídios nesta partícula (CAMONT *et al.*, 2011). A razão HDL-C/apo AI foi aumentada no pós-HD dos subgrupos (40-49 anos, $p < 0,05$ e >60 anos, $p < 0,01$). Estes achados resultam em maior carga de colesterol na HDL o que pode sugerir aumento no tamanho desta partícula após a HD (ABBASI *et al.*, 2013a). Fernandez *et al.* (2010) demonstrou que a elevação do HDL-C foi diretamente correlacionado ao aumento do diâmetro da HDL e, de acordo com Vekic *et al.* (2007) as subclasses com maior diâmetro (HDL_{2a} e HDL_{2b}) desta lipoproteína são negativamente correlacionadas a DCV, em contraste, as menores (HDL_{3a}, HDL_{3b} and HDL_{3c}) são positivamente correlacionadas a eventos cardiovasculares, o que denota possível influência do subtipo da HDL no risco cardíaco.

7. CONCLUSÕES

- Houve elevação no nível sérico da PON-1 no pós-HD, desta forma, a hemodiálise pode interferir na estrutura da HDL podendo ocasionar alterações no seu metabolismo.
- A correlação positiva entre a incorporação de PL-¹⁴C e atividade da PON-1, pode sugerir que a atividade da paraoxonase é diretamente proporcional à transferência de fosfolípidios para a HDL.
- Foi observada redução significativa na porcentagem de incorporação de PL-¹⁴C, o que pode indicar redução da atividade da PLTP no pós-HD.
- Houve elevação dos níveis séricos da apo AI e apo B no pós-HD, no entanto não foi encontrada diferença significativa na relação apo B/apo AI, ou seja, a elevação desses parâmetros foi proporcional.
- O índice não-HDL-C/HDL-C foi reduzido com diferença significativa no pós-HD. A avaliação desta razão de risco, principalmente por se tratar de pacientes hipertrigliceridêmicos, demonstra redução do risco CVD no pós-HD.
- Apesar de não haver alteração na aterogenicidade sérica para as razões (TG/HDL-C e LDL-C/apo B), a redução do IAP mostrou possível redução na exposição do endotélio vascular a LDL pequena e densa no pós-HD.
- A razão HDL-C/apo AI revelou melhora no transporte reverso em função da maior quantidade de colesterol carregada por partícula de HDL no pós-HD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, A. *et al.* Role of hdl cholesterol and estimates of hdl particle composition in future development of type 2 diabetes in the general population: The prevend study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 8, p. E1352-1359, aug. 2013a.

AL-TAI, W. F.; JAFFER, E. M. H.; ALI, Z. A. Evaluating the utility of plasma atherogenic index among several atherogenic parameters in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis. **J. Fac. Med. Baghdad**, v. 54, n. 3, p. 2012.

ALBERS, J. J.; VULETIC, S.; CHEUNG, M. C. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. **Bioch. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Cell Biol. Lipids**, v. 1821, n. 3, p. 345-357, 2012.

ATTMAN, P. O. *et al.* Dialysis modalities and dyslipidemia. **Kidney Int. Suppl**, n. 84, p. S110-112, may. 2003.

BERTOLUCI, M. C. *et al.* Insulin resistance and triglyceride/hdlc index are associated with coronary artery disease. **Diabetol. Metab. Syndr**, v. 2, p. 11, 2010.

BOWLING, C. B.; MUNTNER, P. Epidemiology of chronic kidney disease among older adults: A focus on the oldest old. **J. Gerontol. Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 67, n. 12, p. 1379-1386, 2012.

BRASCHI, S. *et al.* The expression of apolipoprotein b epitopes is normal in ldl of diabetic and end-stage renal disease patients. **Diabetologia**, v. 49, n. 6, p. 1394-1401, jun. 2006.

BRITES, F. D. *et al.* Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low hdl-cholesterol levels. **Atherosclerosis**, v. 152, n. 1, p. 181-192, sep. 2000.

CABARKAPA, V. *et al.* Evaluation of lipid parameters and bioindices in patients with different stages of chronic renal failure. **Vojnosanitetski pregled**, v. 69, n. 11, p. 961-966, 2012.

CACCIAGIU, L. D. *et al.* Hdl-associated enzymes and proteins in hemodialysis patients. **Clin. Biochem.**, v. 45, n. 3, p. 243-248, feb. 2012.

CAMONT, L.; CHAPMAN, M. J.; KONTUSH, A. Biological activities of hdl subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. **Trends Mol. Med.**, v. 17, n. 10, p. 594-603, oct. 2011.

CAMPS, J. *et al.* Ppars in regulation of paraoxonases: Control of oxidative stress and inflammation pathways. **PPAR Res**, v. 2012, p. 616371, 2012.

CASTELLI, W. P.; ABBOTT, R. D.; MCNAMARA, P. M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. **Circulation**, v. 67, n. 4, p. 730-734, apr. 1983.

- CHADE, A. R.; LERMAN, A.; LERMAN, L. O. Kidney in early atherosclerosis. **Hypertension**, v. 45, n. 6, p. 1042-1049, jun. 2005.
- CHANNON, K. M. *et al.* Investigation of lipid transfer in human serum leading to the development of an isotopic method for the determination of endogenous cholesterol esterification and transfer. **Atherosclerosis**, v. 80, n. 3, p. 217-226, jan. 1990.
- CHAWLA, V. *et al.* Hyperlipidemia and long-term outcomes in nondiabetic chronic kidney disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 5, n. 9, p. 1582-1587, sep. 2010.
- CHEN, S. C. *et al.* Association of dyslipidemia with renal outcomes in chronic kidney disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e55643. 2013.
- CHEN, X. *et al.* Plasma pltp activity is inversely associated with hdl-c levels. **Nutr Metab (Lond)**, v. 6, n., p. 49. 2009.
- CHMIELEWSKI, M. *et al.* Lipid disorders in chronic kidney disease: Reverse epidemiology and therapeutic approach. **J Nephrol**, v. 21, n. 5, p. 635-644, sep-oct. 2008.
- CHO, K. H. Biomedical implications of high-density lipoprotein: Its composition, structure, functions, and clinical applications. **BMB Rep**, v. 42, n. 7, p. 393-400, jul. 2009.
- CHU, M. *et al.* Serum small-dense ldl abnormalities in chronic renal disease patients. **Br J Biomed Sci**, v. 69, n. 3, p. 99-102. 2012.
- COHEN TERVAERT, J. W. Cardiovascular disease due to accelerated atherosclerosis in systemic vasculitides. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 27, n. 1, p. 33-44, feb. 2013.
- COLHOUN, H. M. *et al.* Relationship of phospholipid transfer protein activity to hdl and apolipoprotein b-containing lipoproteins in subjects with and without type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 11, p. 3300-3305, nov. 2002.
- CORREIA J. D.; PERRY, I. D. S. Modulação dietética da atividade da paraoxonase: Revisão de estudos em humanos. **Rev HCPA**, v. 30, n. 3, p. 71-278. 2010.
- DA LUZ, P. L. *et al.* High ratio of triglycerides to hdl-cholesterol predicts extensive coronary disease. **Clinics**, v. 63, n. 4, p. 2008.
- DAY, J. R. *et al.* Complete cDNA encoding human phospholipid transfer protein from human endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 269, n. 12, p. 9388-9391, mar 25. 1994.
- DE VRIES, R. *et al.* Elevated plasma phospholipid transfer protein activity is a determinant of carotid intima-media thickness in type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 49, n. 2, p. 398-404, feb. 2006.
- DIEPEVEEN, S. H. *et al.* Cholesterol in end-stage renal disease: The good, the bad or the ugly? **Neth J Med**, v. 66, n. 2, p. 53-61, feb. 2008.
- DRAGANOV, D. I.; LA DU, B. N. Pharmacogenetics of paraoxonases: A brief review. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 369, n. 1, p. 78-88, jan. 2004.

DULLAART, R. P.; VAN TOL, A.; DALLINGA-THIE, G. M. Phospholipid transfer protein, an emerging cardiometabolic risk marker: Is it time to intervene? **Atherosclerosis**, v. 228, n. 1, p. 38-41, may. 2013.

ELIASSON, B. *et al.* Clinical usefulness of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in type 2 diabetes: A report from the swedish national diabetes register. **Diabetes Care**, v. 34, n. 9, p. 2095-2100, sep. 2011.

ELMACHTANI IDRISSE, S. *et al.* [lipid profile of patients on chronic hemodialysis (morocco)]. **Sante**, v. 21, n. 1, p. 27-31, jan-mar. 2011.

EMADZADEH, M. R. *et al.* Changes in small dense low-density lipoprotein levels following acute coronary syndrome. **Angiology**, v. 64, n. 3, p. 216-222, Apr. 2013.

ERDUR, M. F. *et al.* The relationship between atherogenic index of plasma and epicardial adipose tissue in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. **Ren Fail**, v. 35, n. 9, p. 1193-1198, oct. 2013.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Apolipoproteínas b e a-i: Fatores de risco cardiovascular? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n., p. 276-282. 2007.

GIMENO-ORNA, J. A.; FAURE-NOGUERAS, E.; SANCHO-SERRANO, M. A. Usefulness of total cholesterol/hdl-cholesterol ratio in the management of diabetic dyslipidaemia. **Diabet Med**, v. 22, n. 1, p. 26-31, jan. 2005.

GOU, L. *et al.* Alterations of high-density lipoprotein subclasses in endogenous hypertriglyceridemia. **Am Heart J**, v. 150, n. 5, p. 1039-1045, nov. 2005.

GUGLIUCCI, A.; KOTANI, K.; KIMURA, S. Paraonase 1 in chronic kidney failure. **J Lipids**, v. 2012, n., p. 726048. 2012.

GUGLIUCCI, A. *et al.* Acrolein inactivates paraonase 1: Changes in free acrolein levels after hemodialysis correlate with increases in paraonase 1 activity in chronic renal failure patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 384, n. 1-2, p. 105-112. 2007.

GUGLIUCCI, A. *et al.* Paraonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: Correlation with low molecular age adduct clearance. **Clin Chim Acta**, v. 377, n. 1-2, p. 213-220, feb. 2007.

HADAEGH, F. *et al.* Triglyceride/hdl-cholesterol ratio is an independent predictor for coronary heart disease in a population of iranian men. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 19, n. 6, p. 401-408, jul. 2009.

HANAK, V. *et al.* Accuracy of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio for prediction of the low-density lipoprotein phenotype b. **Am J Cardiol**, v. 94, n. 2, , p. 219-222, jul 15. 2004.

HATTORI, M. *et al.* Mechanisms of glomerular macrophage infiltration in lipid-induced renal injury. **Kidney Int Suppl**, v. 71, n., p. S47-50, jul. 1999.

- HERMANS, M. P.; AHN, S. A.; ROUSSEAU, M. F. The non-hdl-c/hdl-c ratio provides cardiovascular risk stratification similar to the apob/apoa1 ratio in diabetics: Comparison with reference lipid markers. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 1, n. 1, p. 23-28. 2007.
- HOLMAN, R. R. *et al.* Non-hdl cholesterol is less informative than the total-to-hdl cholesterol ratio in predicting cardiovascular risk in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 7, p. 1796-1797, jul. 2005.
- HOLMES, D. T.; FROHLICH, J.; BUHR, K. A. The concept of precision extended to the atherogenic index of plasma. **Clin Biochem**, v. 41, n. 7-8, p. 631-635, may. 2008.
- HOLZER, M. *et al.* Uremia alters hdl composition and function. **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 9, p. 1631-1641, sep. 2011.
- HUANG, F. *et al.* Both serum apolipoprotein b and the apolipoprotein b/apolipoprotein a-i ratio are associated with carotid intima-media thickness. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54628. 2013.
- HUUSKONEN, J. *et al.* The impact of phospholipid transfer protein (pltp) on hdl metabolism. **Atherosclerosis**, v. 155, n. 2, p. 269-281, apr. 2001.
- JAMES, R. W.; DEAKIN, S. P. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 12, p. 1986-1994. dec 15. 2004.
- JIANG, X. C.; JIN, W.; HUSSAIN, M. M. The impact of phospholipid transfer protein (pltp) on lipoprotein metabolism. **Nutr Metab (Lond)**, v. 9, n. 1, p. 75. 2012.
- JOLES, J. A. *et al.* Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats. **J Am Soc Nephrol**, v. 11, n. 4, p. 669-683, apr. 2000.
- KAPPELLE, P. J. *et al.* Common variation in cholesteryl ester transfer protein: Relationship of first major adverse cardiovascular events with the apolipoprotein b/apolipoprotein a-i ratio and the total cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol ratio. **J Clin Lipidol**, v. 7, n. 1, p. 56-64, jan-feb. 2013.
- KAYSEN, G. A. Lipid and lipoprotein metabolism in chronic kidney disease. **Journal of Renal Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 73-77. 2009.
- KEANE, W. F.; TOMASSINI, J. E.; NEFF, D. R. Lipid abnormalities in patients with chronic kidney disease: Implications for the pathophysiology of atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 20, n. 2, p. 123-133, feb 22. 2013.
- KENNEDY, D. J. *et al.* Diminished antioxidant activity of high-density lipoprotein-associated proteins in chronic kidney disease. **J Am Heart Assoc**, v. 2, n. 2, p. e000104, apr. 2013.

KIM, S. W. *et al.* Non-hdl-cholesterol/hdl-cholesterol is a better predictor of metabolic syndrome and insulin resistance than apolipoprotein b/apolipoprotein a1. **Int J Cardiol**, v., n., p., mar 29. 2013.

KIMAK, E. *et al.* Association between moderately oxidized low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclass distribution in hemodialyzed and post-renal transplant patients. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 12, n. 5, p. 365-371, may. 2011.

KINOSIAN, B.; GLICK, H.; GARLAND, G. Cholesterol and coronary heart disease: Predicting risks by levels and ratios. **Ann Intern Med**, v. 121, n. 9, p. 641-647, nov 1. 1994.

KIRMIZIS, D. *et al.* Serum lipid profile constituents as markers of cardiovascular morbidity in patients on chronic hemodialysis. **Biomark Insights**, v. 1, n., p. 185-192. 2007.

KOBA, S. *et al.* Small dense ldl phenotype is associated with postprandial increases of large vldl and remnant-like particles in patients with acute myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 1, p. 131-140, sep. 2003.

KONTUSH, A.; CHAPMAN, M. J. Antiatherogenic small, dense hdl--guardian angel of the arterial wall? **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v. 3, n. 3, p. 144-153, mar. 2006.

KOTANI, K.; KIMURA, S.; GUGLIUCCI, A. Paraoxonase-1 and ischemia-modified albumin in patients with end-stage renal disease. **J Physiol Biochem**, v. 67, n. 3, Sep, p. 437-441. 2011.

KWAN, B. C. *et al.* Lipoprotein metabolism and lipid management in chronic kidney disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 4, p. 1246-1261, apr. 2007.

KWON, C. H. *et al.* Low-density lipoprotein cholesterol to apolipoprotein b ratio is independently associated with metabolic syndrome in korean men. **Metabolism**, v. 60, n. 8, p. 1136-1141, aug. 2011.

LACQUANITI, A. *et al.* Alterations of lipid metabolism in chronic nephropathies: Mechanisms, diagnosis and treatment. **Kidney Blood Press Res**, v. 33, n. 2, p. 100-110. 2010.

LAHRACH, H. *et al.* Serum paraoxonase activity, high-sensitivity c-reactive protein, and lipoprotein disturbances in end-stage renal disease patients on long-term hemodialysis. **J Clin Lipidol**, v. 2, n. 1, p. 43-50, feb. 2008.

LEANÇA, C. C. *et al.* Hdl: O yin-yang da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 9, p. 777-. 2010.

LEE, I. T. *et al.* High total-to-hdl cholesterol ratio predicting deterioration of ankle brachial index in asian type 2 diabetic subjects. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 79, n. 3, p. 419-426, mar. 2008.

LEMIEUX, I. *et al.* Total cholesterol/hdl cholesterol ratio vs ldl cholesterol/hdl cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: The quebec cardiovascular study. **Arch Intern Med**, v. 161, n. 22, , p. 2685-2692, dec 10-24. 2001.

LEVEY, A. S. *et al.* The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: A kidney controversies conference report. **Kidney Int**, v. 80, n. 1, p. 17-28, jul. 2010.

LIKIDLILID, A. *et al.* Paraoxonase 1 polymorphisms as the risk factor of coronary heart disease in a thai population. **Acta Cardiol**, v. 65, n. 6, p. 681-691, dec. 2010.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 3, p. 169-178. 2006.

MASSON, D. *et al.* Worsening of diet-induced atherosclerosis in a new model of transgenic rabbit expressing the human plasma phospholipid transfer protein. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 4, p. 766-774, apr. 2011.

MAY, H. T. *et al.* A new ratio for better predicting future death/myocardial infarction than standard lipid measurements in women >50 years undergoing coronary angiography: The apolipoprotein a1 remnant ratio (apo a1/ [vldl(3)+idl]). **Lipids Health Dis**, v. 12, n., p. 55. 2013.

MCCULLOUGH, P. A.; AL-EJEL, F.; MAYNARD, R. C. Lipoprotein subfractions and particle size in end-stage renal disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 6, n. 12, p. 2738-2739, dec. 2011.

MITWALLI, A. H. *et al.* Dyslipidemia in dialysis patients. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 22, n. 4, p. 689-694, jul. 2011.

MOHAMED, R. H.; KARAM, R. A.; ABD EL-AZIZ, T. A. The relationship between paraoxonase1-192 polymorphism and activity with coronary artery disease. **Clin Biochem**, v. 43, n. 6, p. 553-558, apr. 2010.

MONTAZERIFAR, F. *et al.* Hemodialysis alters lipid profiles, total antioxidant capacity, and vitamins a, e, and c concentrations in humans. **J Med Food**, v. 13, n. 6, p. 1490-1493, dec. 2010.

MORADI, H. *et al.* Reverse cholesterol transport pathway in experimental chronic renal failure. **American Journal of Nephrology**, v. 30, n. 2, p. 147-154. 2009.

NAIR, D. *et al.* Association of total cholesterol/ high-density lipoprotein cholesterol ratio with proximal coronary atherosclerosis detected by multislice computed tomography. **Prev Cardiol**, v. 12, n. 1, Winter, p. 19-26. 2009.

NASSTROM, B. *et al.* A single bolus of a low molecular weight heparin to patients on haemodialysis depletes lipoprotein lipase stores and retards triglyceride clearing. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, n. 6, p. 1172-1179. 2005.

NAVARRO, J. F. *et al.* Effects of atorvastatin on lipid profile and non-traditional cardiovascular risk factors in diabetic patients on hemodialysis. **Nephron Clin Pract**, v. 95, n. 4, p. c128-135. 2003.

NG, C. J. *et al.* The paraoxonase gene family and atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**, v. 38, n. 2, p. 153-163, jan 15. 2005.

NISHIZAWA, Y. *et al.* Non-high-density lipoprotein cholesterol (non-hdl-c) as a predictor of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. **Kidney Int Suppl**, v., n. 84, p. S117-120, may. 2003.

OKA, T. *et al.* Distribution of phospholipid transfer protein in human plasma: Presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive. **J Lipid Res**, v. 41, n. 10, p. 1651-1657, oct. 2000.

OSLAKOVIC, C. *et al.* The role of phospholipid transfer protein in lipoprotein-mediated neutralization of the procoagulant effect of anionic liposomes. **J Thromb Haemost**, v. 8, n. 4, p. 766-772, apr. 2010.

OSLAKOVIC, C. *et al.* Anionic phospholipids lose their procoagulant properties when incorporated into high density lipoproteins. **J Biol Chem**, v. 284, n. 9, p. 5896-5904, feb 27. 2009.

PANAYIOTOU, A. *et al.* Apob/apoa1 ratio and subclinical atherosclerosis. **Int Angiol**, v. 27, n. 1, p. 74-80, feb. 2008.

PARAGH, G. *et al.* The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. **Nephron**, v. 80, n. 2, p. 166-170, oct. 1998.

PARAMSOTHY, P. *et al.* Age-modification of lipoprotein, lipid, and lipoprotein ratio-associated risk for coronary artery calcium (from the multi-ethnic study of atherosclerosis [mesa]). **Am J Cardiol**, v. 105, n. 3, p. 352-358, feb 1. 2010.

PAREKH, R. S. *et al.* The association of sudden cardiac death with inflammation and other traditional risk factors. **Kidney Int**, v. 74, n. 10, p. 1335-1342, nov. 2008.

PETERS, A. L. Clinical relevance of non-hdl cholesterol in patients with diabetes. **Clinical Diabetes**, v. 26, n. 1, p. 3(5). 2008.

PODREZ, E. A. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 37, n. 7, p. 719-725, jul. 2010.

PRAKASH, M. *et al.* Paraoxonase: Its antiatherogenic role in chronic renal failure. **Indian J Nephrol**, v. 20, n. 1, p. 9-14, jan. 2010.

RAJKOVIC, M. G. *et al.* Effect of non-genetic factors on paraoxonase 1 activity in patients undergoing hemodialysis. **Clin Biochem**, v. 43, n. 18, p. 1375-1380, dec. 2010.

REINER, Z. *et al.* Esc/eas guidelines for the management of dyslipidaemias: The task force for the management of dyslipidaemias of the european society of cardiology (esc) and the european atherosclerosis society (eas). **Eur Heart J**, v. 32, n. 14, p. 1769-1818, jul. 2011.

RIBEIRO, S. *et al.* Main determinants of pon1 activity in hemodialysis patients. **Am J Nephrol**, v. 36, n. 4, p. 317-323. 2012.

RIZZO, M. *et al.* Low-density-lipoprotein peak particle size in a mediterranean population. **Eur J Clin Invest**, v. 33, n. 2, p. 126-133, feb. 2003.

ROBINS, S. J. *et al.* Plasma lipid transfer proteins and cardiovascular disease. The framingham heart study. **Atherosclerosis**, v. 228, n. 1, p. 230-236, may. 2013.

ROEHRS, M. *et al.* The relationships between exogenous and endogenous antioxidants with the lipid profile and oxidative damage in hemodialysis patients. **BMC Nephrol**, v. 12, n., p. 59. 2011.

RYE, K. A.; BARTER, P. J. Regulation of high-density lipoprotein metabolism. **Circ Res**, v. 114, n. 1, p. 143-156, jan 3. 2014.

SAEED, S. A. *et al.* Paraoxonase-1 (pon1) activity as a risk factor for atherosclerosis in chronic renal failure patients. **Hemodial Int**, v. 12, n. 4, p. 471-479, Oct. 2008.

SARNAK, M. J. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: A statement from the american heart association councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology, and epidemiology and prevention. **Circulation**, v. 108, n. 17, p. 2154-2169. 2003.

SCHGOER, W. *et al.* Low phospholipid transfer protein (pltp) is a risk factor for peripheral atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 196, n. 1, p. 219-226, jan. 2008.

SCHIFFRIN, E. L.; LIPMAN, M. L.; MANN, J. F. E. Chronic kidney disease: Effects on the cardiovascular system. **Circulation**, v. 116, n. 1, p. 85-97. 2007.

SCHLITT, A. *et al.* Phospholipid transfer protein in hemodialysis patients. **Am J Nephrol**, v. 27, n. 2, p. 138-143. 2007.

SCHLITT, A. *et al.* Anti-inflammatory effects of phospholipid transfer protein (pltp) deficiency in mice. **Biochim Biophys Acta**, v. 1733, n. 2-3, p. 187-191, apr 15. 2005.

SESSO, R. D. C. C. *et al.* Diálise crônica no brasil - relatório do censo brasileiro de diálise, 2011. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n., p. 272-277. 2012.

SETTASATIAN, N. *et al.* The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. **J Biol Chem**, v. 276, n. 29, p. 26898-26905, jul 20. 2001.

SHOJI, T. *et al.* Chronic kidney disease, dyslipidemia, and atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 19, n. 4, p. 299-315. 2011.

STOKKE, K. T.; NORUM, K. R. Determination of lecithin: Cholesterol acyltransfer in human blood plasma. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 27, n. 1, p. 21-27, feb. 1971.

SUEHIRO, T. *et al.* Serum paraoxonase (pon1) concentration in patients undergoing hemodialysis. **J Atheroscler Thromb**, v. 9, n. 3, p. 133-138. 2002.

SVIRIDOV, D. *et al.* Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: How much versus how good. **J Atheroscler Thromb**, v. 15, n. 2, p. 52-62, apr. 2008.

SZTANEK, F. *et al.* Decreased paraoxonase 1 (pon1) lactonase activity in hemodialyzed and renal transplanted patients. A novel cardiovascular biomarker in end-stage renal disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, n. 7, p. 2866-2872, jul. 2012.

TANI, S. *et al.* Low-density lipoprotein cholesterol/apolipoprotein b ratio may be a useful index that differs in statin-treated patients with and without coronary artery disease: A case control study. **Int Heart J**, v. 52, n. 6, p. 343-347. 2011.

TIAN, L. *et al.* Characteristics of high-density lipoprotein subclasses distribution for subjects with desirable total cholesterol levels. **Lipids Health Dis**, v. 10, n., p. 64. 2011.

TSIMIHODIMOS, V.; MITROGIANNI, Z.; ELISAF, M. Dyslipidemia associated with chronic kidney disease. **Open Cardiovasc Med J**, v. 5, n., p. 41-48. 2011.

TSUNODA, F. *et al.* Association between small dense low-density lipoprotein and postprandial accumulation of triglyceride-rich remnant-like particles in normotriglyceridemic patients with myocardial infarction. **Circ J**, v. 68, n. 12, p. 1165-1172, dec. 2004.

TZOTZAS, T.; EVANGELOU, P.; KIORTSIS, D. N. Obesity, weight loss and conditional cardiovascular risk factors. **Obes Rev**, v. 12, n. 5, p. e282-289, may. 2011.

VAN DER STEEG, W. A. *et al.* High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein a-i: Significance for cardiovascular risk: The ideal and epic-norfolk studies. **J Am Coll Cardiol**, v. 51, n. 6, p. 634-642, feb 12. 2008.

VAZIRI, N. D. Causes of dysregulation of lipid metabolism in chronic renal failure. **Seminars in Dialysis**, v. 22, n. 6, p. 644-651. 2009.

VAZIRI, N. D. Dyslipidemia of chronic renal failure: The nature, mechanisms, and potential consequences. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 290, n. 2, p. F262-272, feb. 2006.

VAZIRI, N. D.; NORRIS, K. Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease. **Blood Purif**, v. 31, n. 1-3, p. 189-196. 2011.

VAZIRI, N. D.; NORRIS, K. Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease. **Blood Purification**, v. 31, n. 1-3, p. 189-196. 2011.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. Apolipoprotein b and apolipoprotein a-i: Risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. **J Intern Med**, v. 255, n. 2, p. 188-205, feb. 2004.

WALLDIUS, G. *et al.* The apob/apoa-i ratio is better than the cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. **Clin Chem Lab Med**, v. 42, n. 12, p. 1355-1363. 2004.

WALLDIUS, G. *et al.* High apolipoprotein b, low apolipoprotein a-i, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (amoris study): A prospective study. **Lancet**, v. 358, n. 9298, p. 2026-2033, dec 15. 2001.

WANG, M. *et al.* Quantitative assessment of the influence of paraoxonase 1 activity and coronary heart disease risk. **DNA Cell Biol**, v. 31, n. 6, p. 975-982, jun. 2012.

WANNER, C. *et al.* Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. **N Engl J Med**, v. 353, n. 3, p. 238-248, jul 21. 2005.

WEICHHART, T. *et al.* Serum amyloid a in uremic hdl promotes inflammation. **J Am Soc Nephrol**, v. 23, n. 5, p. 934-947, may. 2012.

XAVIER, H. T. *et al.* V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n., p. 1-20. 2013.

YAMAMOTO, S.; KON, V. Mechanisms for increased cardiovascular disease in chronic kidney dysfunction. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 18, n. 3, p. 181-188. 2009.

YAN, D. *et al.* Pltp deficiency improves the anti-inflammatory properties of hdl and reduces the ability of ldl to induce monocyte chemotactic activity. **J Lipid Res**, v. 45, n. 10, p. 1852-1858, oct. 2004.

YANG, D.; LIU, X.; XIANG, M. The correlation between lipids ratio and degree of coronary artery stenosis. **High Blood Press Cardiovasc Prev**, v. 18, n. 2, p. 53-56, jun 1. 2011.

YAO, Q. *et al.* Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. **Scand J Urol Nephrol**, v. 38, n. 5, p. 405-416. 2004.

YAZDANYAR, A.; YEANG, C.; JIANG, X.-C. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 13, n. 3, p. 242-248. 2011.

YILDIZ, G. *et al.* Evaluation of association between atherogenic index of plasma and intima-media thickness of the carotid artery for subclinic atherosclerosis in patients on maintenance hemodialysis. **Hemodial Int**, v. 17, n. 3, p. 397-405, jul. 2013.

YUNKE, Z.; GUOPING, L.; ZHENYUE, C. Triglyceride-to-hdl cholesterol ratio : Predictive value for chd severity and new-onset heart failure. **Herz**, v., n., Apr 17, p. 2013.

YUSUF, S. *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the interheart study): Case-control study. **Lancet**, v. 364, n. 9438, p. 937-952, sep 11-17. 2004.

ZHAO, Y. *et al.* Association between pon1 activity and coronary heart disease risk: A meta-analysis based on 43 studies. **Mol Genet Metab**, v. 105, n. 1, p. 141-148, jan. 2012.

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-ESCLARECIDO

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

1. NOME DO PACIENTE

 DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°:SEXO: (X) M () F
 DATA DE NASCIMENTO:/...../.....
2. RESPONSÁVEL LEGAL:

 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc).....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°:SEXO: (X) M () F
 DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

EFEITO DA HEMODIÁLISE NO REMODELAMENTO DE PARTÍCULAS DE HDL: ATIVIDADE DA PARAOXONASE/ARIL-ESTERASE E PLTP COMO MEDIDAS DE PROTEÇÃO E RISCO CARDIOVASCULAR

PESQUISADOR: PROF. DR. RICARDO DAVID COUTO (Coordenador)
 CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR ADJUNTO IV DO DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA – BA N° 2884

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

- () SEM RISCO () RISCO MÍNIMO () RISCO MÉDIO
 () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR

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

1. Justificativa – os achados desse estudo podem influenciar positivamente na prevenção ou instituição do melhor protocolo terapêutico para a dislipidemia urêmica.

2. Objetivos da pesquisa – Avaliar o efeito da hemodiálise no remodelamento de partículas de HDL através da incorporação *in vitro* de fosfolipídios entre as lipoproteínas plasmáticas, utilizando métodos quimioluminescentes e radioisotópicos, seguido dos fatores que podem

influenciar este fenômeno, como a atividade da PLTP (HDL), da paraoxonase (PON1), tamanho estimado das partículas de HDL, e a participação da capacidade oxidativa total como medidas de proteção e risco cardiovascular.

3. Protocolo experimental – Serão utilizadas as amostras por conveniência provenientes do laboratório de análises clínicas do hospital Ana Neri que forem destinadas a descarte por este serviço.

4. Avaliação do grau de risco – Todos os procedimentos não acarretarão riscos de contaminação para os participantes, nem qualquer tipo de problema para sua saúde.

5. Benefícios – A pesquisa proporcionará avanços na área cardiovascular, prevenção de doenças cardiovasculares através da identificação precoce dos fatores e marcadores de risco.

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

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. **Sim**
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. **Sim**
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. **Sim**

V. INFORMAÇÕES DE NOME E TELEFONES DO RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Ricardo David Couto

Orientador - Contatos: Tel.xx71-3283-6952/8093/8095, Cel. xx71-9963-8131

Franciane Santos Marques

Doutoranda - Contatos: Tel.xx71-9189-3088

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

Salvador _____/_____/_____

Assinatura do sujeito ou responsável:

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO

(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterá o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário de pesquisa do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CEP deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.