

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

TESE DE DOUTORADO

**EFEITO DA MENOPAUSA E DA HIPERTRIGLICERIDEMIA NA
TRANSFERÊNCIA DE LÍPIDES E ATIVIDADE DA PARAOXONASE
EM MULHERES DIABÉTICAS**

LUCIANA BASTIANELLI KNOP

Salvador – Bahia

2018

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**EFEITO DA MENOPAUSA E DA HIPERTRIGLICERIDEMIA NA
TRANSFERÊNCIA DE LÍPIDES E ATIVIDADE DA PARAOXONASE
EM MULHERES DIABÉTICAS**

LUCIANA BASTIANELLI KNOP

Orientador: Prof. Dr. Ricardo David Couto

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

Salvador – Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Knop, Luciana Bastianelli.

K72e Efeito da menopausa e da hipertrigliceridemia na transferência de lípidos e atividade da paraoxonase em mulheres diabéticas/ Luciana Bastianelli Knop. - 2018.

80f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo David Couto, Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia.

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

1. Hipertrigliceridemia. 2. Menopausa. 3. Lípidos. 4. Diabetes Tipo II. 5. Paraoxonase. I. Título.

CDU 616.379-008.64

" EFEITO DA MENOPAUSA E DA HIPERTRIGLICERIDEMIA NA TRANSFERÊNCIA DE LÍPIDES E ATIVIDADE DA PARAOXONASE EM MULHERES DIABÉTICAS."

LUCIANA MARIA PONDÉ BASTIANELLI KNOP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 26 de outubro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Raül Cavalcante Maranhão
Professor Titular
FCF/USP



Dr. Roque Aras Junior
Professor Associado III
UFBA



Dr. Ajax Mercês Atta
Professor Titular
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A meu filho, Rafael, luz da minha vida.

A meu amor, Christian, meu porto seguro.

A meu pai, Piero (*in memoriam*), por todo amor que houver nesta vida.

A minha mãe, Gilda, que vibra comigo.

A Tobi, Bela, Jacó e Margarida que fazem meus dias mais felizes.

AGRADECIMENTOS

Há agradecimentos e há gratidão. Sob certas circunstâncias ambos são sinônimos e podem ser usados para o mesmo fim de semântica. Mas não aqui. Meus agradecimentos são especiais a todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa da Fundação Oswaldo Cruz, que me inspiraram durante todo o Curso, aos profissionais da Biblioteca, em especial à Sra. Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, e a todos os funcionários que com zelo e carinho sempre me conduziram, informaram e, neste particular, meus agradecimentos especiais a Iumara Oliveira Evangelista e Noelia Jurema Brito dos Santos.

Os agradecimentos se estendem à família, aos amigos, colaboradores, como Leonor Amaral e aos profissionais do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, em especial Julio César de Abreu Santos, que me auxiliaram na coleta, anamnese dos pacientes e demais informações.

Agradecimentos especiais também ao Prof. Raul Maranhão pela sua imensa colaboração nas discussões, na execução das técnicas utilizadas no estudo, bem como Thauany Martins Tavoni, pela sua recepção e auxílio na execução dos métodos usados no estudo e participação nas discussões das hipóteses que esse trabalho levantou.

Mas, além do agradecimento, existe a gratidão. Minha gratidão vai ao Prof. Dr. Ricardo Couto David, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho, não apenas pelos dados técnicos, mas pela sua devoção ao aluno a quem estar por formar: mestre, doutor ou graduando. Sua devoção é incomensurável e acolhedora, não há melhor orientador. Tudo vai além dos dados encontrados, relevantes ou não, possíveis ou não. Os dados acabam por se traduzir em algo humano, em que o fato de discutir com o aluno seus resultados torna a ciência humana em todos os sentidos: na vontade de ensinar, de ajudar, de fazer do aluno um indivíduo maduro e consciente do seu trabalho e de sua responsabilidade e, maior, de sua paixão pelo seu trabalho. Obrigada, professor Ricardo, a minha gratidão de hoje e de sempre. Foram muitos percalços em minha vida durante todo esse doutorado, mas sem você essas pausas seriam para sempre e uma conquista seria perdida. Obrigada por não me deixar perdê-la.

A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.

George Bernard Shaw

KNOP, Luciana Bastianelli. Efeito da menopausa e da hipertrigliceridemia na transferência de lípidos e atividade da paraoxonase em mulheres diabéticas. 2018. 80 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A alta prevalência da diabetes mellitus tipo 2 (DM2) na população e complicações associadas à doença, como a doença aterosclerótica cardiovascular, estão cada vez mais presentes na mulher. Na DM2, observam-se alterações lipoproteicas, principalmente a hipertrigliceridemia, alterações que são agravadas na menopausa. Estudos têm demonstrado que a transferência *in vitro* de lípidos para a HDL e a determinação da atividade da paraoxonase são métodos robustos para a avaliação funcional da HDL, uma vez que, no diabetes, a função protetora da HDL está alterada. **OBJETIVO:** O objetivo do estudo foi o de verificar se há diferença na atividade da paraoxonase e na transferência de lípidos para a HDL em função da presença de hipertrigliceridemia e menopausa em mulheres DM2. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram coletadas amostras de sangue de 63 pacientes do gênero feminino, diabéticas do tipo 2, entre 25 e 70 anos, pareadas por faixa etária e comorbidades associadas. Foram realizadas determinações laboratoriais para diabetes e dislipidemia; transferência *in vitro* de lípidos radioativamente marcados, de uma nanopartícula (LDE) artificial para a HDL, por cintilação líquida, assim como, a atividade da paraoxonase por espectrofotometria. Para a análise dos dados foi realizada estatística descritiva e inferencial; cálculo do tamanho amostral, teste de normalidade, cálculo de valores extremos, teste t não pareado, e análise de correlação linear de Pearson. **RESULTADOS:** Os resultados apresentaram uma diferença na atividade da paraoxonase-1 em função da intensidade da hipertrigliceridemia entre os grupos, independente da condição de menopausa ou não (teste t não pareado; $p < 0,05$). Além disso, observou-se também diferença na transferência de fosfolípidos entre os grupos, assim como, uma correlação linear positiva entre a transferência de fosfolípidos e colesterol éster ($r = 0,94$; $p = 0,0004$), e uma correlação linear negativa ($r = -0,617$; $p = 0,038$) na redução da transferência de colesterol éster em função da intensidade da hipertrigliceridemia. **DISCUSSÃO:** Apesar de as determinações laboratoriais bioquímicas convencionais não terem apresentado significância quanto à verificação e comparação das pacientes diabéticas normo e hipertrigliceridêmicas em relação à menopausa, observou-se alterações significativas na atividade da paraoxonase e transferência de fosfolípidos e colesterol éster para HDL em mulheres menopausadas quando comparadas àquelas não menopausadas intra e intergrupos. **CONCLUSÃO:** Os achados desse estudo mostram que não apenas a hipertrigliceridemia diabética, mas que, em determinadas condições, a menopausa também influencia o metabolismo da HDL, a ação da paraoxonase e as transferências de fosfolípidos (PL) e colesterol éster (CE) para a HDL.

Palavras-chave: Hipertrigliceridemia diabética, Menopausa, Funcionalidade da HDL, Transferência de lípidos, Atividade da paraoxonase.

KNOP, Luciana Bastianelli. Effect of menopause and hypertriglyceridemia on lipid transfer and paraoxonase activity in diabetic women. 2018. 80 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The high prevalence of type 2 diabetes mellitus (DM2) in the community and the complications associated, such as cardiovascular atherosclerotic, are increasingly in women. Lipoprotein alterations are observed in DM2 that could be aggravated by menopause due to hypertriglyceridemia. Studies have shown that the *in vitro* transfer of lipids to HDL and the determination of paraoxonase activity are robust methods for HDL functional evaluation, since the HDL protective function is altered in diabetes. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to observe if there is a difference in the paraoxonase activity and in the transfer of lipids to HDL due to the presence of hypertriglyceridemia and menopause in DM2 women. **MATERIAL AND METHODS:** Blood samples were collected from 63 female diabetic patients, between 25 and 70 years old, matched by age group and associated comorbidities. *In vitro* transfer of radioactively labeled lipids from an artificial nanoparticle (LDE) to HDL was determined by liquid scintillation, as well as the activity of paraoxonase by spectrophotometry. Laboratory determinations were also performed. For the data analysis, descriptive and inferential statistics were performed; normality test, unpaired t-test, and Pearson's linear correlation analysis was used to calculate the sample size. **RESULTS:** There was a difference in paraoxonase-1 activity between the groups due to the high hypertriglyceridemia, regardless the menopausal or non-menopausal condition (unpaired t-test, $p < 0.05$). In addition, there was also a difference in phospholipid transfer between groups, as well as the presence of positive linear correlation between transfer of phospholipids and cholesterol ester ($r = 0.94$, $p = 0.0004$), and reduction of cholesterol ester transfer due to hypertriglyceridemia (negative linear correlation; $r = -0.617$, $p = 0.038$). **DISCUSSION:** Conventional biochemical laboratory determinations were not significant in the comparison of normal and hypertriglyceridemic diabetic patients in relation to menopause. However, our study showed that there were significant alterations in the activity of paraoxonase and phospholipid and cholesterol ester transfer to HDL in menopausal women when compared to those non-menopausal intra and intergroups. **CONCLUSION:** The findings of this study show that not only diabetic hypertriglyceridemia but menopause also influences HDL metabolism, the action of paraoxonase and the transfer of phospholipid (PL) and cholesterol ester (CE) for HDL under certain conditions,.

Keywords: Diabetic hypertriglyceridemia, Menopause, HDL Functionality, Lipid Transfer, Paraoxonase Activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Pessoas com diabetes no mundo em 2017 (entre 20 e 79 anos para cada 1.000 habitantes) (dados estimados).....	17
Figura 2.	Principais anormalidades lipídicas no diabetes mellitus tipo 2.....	28
Figura 3.	Formação da lipoproteína de alta densidade (HDL).....	29
Figura 4.	Ciclo de vida reprodutiva da mulher.....	33
Figura 5.	Análise de correlação linear de Pearson entre o percentual de ^3HCE e ^{14}CPL transferidos de uma nanoemulsão artificial para a HDL no grupo DM2 TG 150-300mg/dL M....	54
Figura 6.	Análise de correlação linear de Pearson entre o percentual de ^3HCE transferidos de uma nanoemulsão artificial para a HDL com TG no grupo DM2 TG 150-300 mg/dL NM.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Critérios diagnósticos para diabetes.....	23
Tabela 2.	Alterações importantes no metabolismo de lipoproteínas no DM2.....	26
Tabela 3.	Principais características das anormalidades estruturais e funcionais do metabolismo lipídico durante o processo aterogênico, considerando ainda o impacto do DM2 aliado às mudanças fisiológicas associadas ao envelhecimento....	35
Tabela 4(A).	Características gerais dos pacientes do gênero feminino não menopausadas com triglicérides < 150mg/dL.....	47
Tabela 4(B).	Características gerais dos pacientes do gênero feminino menopausadas com triglicérides < 150mg/dL.....	48
Tabela 4(C).	Características gerais dos pacientes do gênero feminino não menopausadas com triglicérides entre 150 e 300mg/dL.....	49
Tabela 4(D).	Características gerais dos pacientes do gênero feminino menopausadas com triglicérides entre 150 e 300mg/dL.....	50
Tabela 5.	Dados dos marcadores bioquímicos e estimativas utilizadas para avaliação das pacientes, estratificadas por grupos entre normotrigliceridêmicas (TG < 150mg/dL) e hipertrigliceridêmicas (TG 150-300mg/dL), não menopausadas (NM) e menopausadas (M) participantes do estudo.....	51
Tabela 6.	Dados da atividade da paraoxonase (PON-1) utilizadas para avaliação das pacientes, estratificadas por grupos entre normotrigliceridêmicas (TG < 150mg/dL) e hipertrigliceridêmicas (TG 150-300mg/dL), não menopausadas (NM) e menopausadas (M) participantes do estudo.....	52
Tabela 7.	Dados de transferência de PL (¹⁴ C-PL) para a HDL, utilizando modelo de lipoproteínas artificiais para avaliação das pacientes, estratificadas por grupos entre normotrigliceridêmicas (TG < 150mg/dL) e hipertrigliceridêmicas (TG 150-300mg/dL), não menopausadas (NM) e menopausadas (M) participantes do estudo.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1	<i>ATP binding cassette subfamily A member 1</i>
ADA	Associação Americana de Diabetes (<i>American Diabetes Association</i>)
Apo B	Apolipoproteína B
ApoA-I/ApA-I	Apolipoproteína A-I
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
CE	Colesterol esterificado
CEP/UFBA	Comitê de Ética em Pesquisa/Universidade Federal da Bahia
CETP	Proteína de transferência do colesterol esterificado (<i>cholesteryl ester transfer protein</i>)
CL	Colesterol livre
CT	Colesterol total
DAC	Doença aterosclerótica cardiovascular
DIU	Dispositivo intra-uterino
DM	Diabetes melittus
DM2	Diabetes melittus do tipo 2
E	Espessura da parede da placa
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FEBRASGO	Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
HDL	Lipoproteínas de alta densidade (<i>high density lipoprotein</i>)
HDL-C	Colesterol HDL
HDLn	HDL nascente

HPLC/CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HSL	Lipase hormônio sensitiva
I.C.	Intervalo de confiança
IDF	Federação Internacional de Diabetes (<i>International Diabetes Federation</i>)
InCor-HCFMUSP-SP	Instituto do Coração - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – São Paulo
LACTIFAR/UFBA	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDE	LDL artificial
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
LDL-C	Colesterol LDL
LDL-ox	LDL oxidada
LDLpd	LDL pequena e densa
LDL-R	Receptor de LDL
LH	Lipase hepática
LpA-I	Lipoproteína A-I
LPL	Lipoproteína lipase
LPL	Lipoproteína lipase
M	Menopausada
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NEFA/AGNE	<i>Non-esterified fatty acid</i> (ácido graxo não esterificado)
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NM	Não menopausada
OMS	Organização Mundial de Saúde

PAF-AH	Fator de ativador de plaquetas – acetil hidrolase (<i>platelet-activating factor acetylhydrolase</i>)
PL	Fosfolípidos (<i>phospholipids</i>)
PLTP	Proteína de Transferência de Fosfolípidos
PNCQ	Programa Nacional de Controle de Qualidade
PON-1	Paraoxonase / aril-esterase
PPSUS	Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
RCT	Transporte reverso do colesterol (<i>reverse cholesterol transport</i>)
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM)
SBPC/ML	Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial
SM	Síndrome metabólica
SR-B1	Receptor “ <i>scavenger</i> ” classe B tipo 1
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TG	Triglicérides
TRH	Terapia de reposição hormonal
TTG	Teste de Tolerância a Glicose
VA	Volume da amostra
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (<i>very low density lipoprotein</i>)
VLDL-C	Colesterol VLDL
VS	<i>Versus</i>
VTR	Volume total da reação
WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	DIABETES: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO.....	21
2.1.1	Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)	22
2.1.2	Diagnóstico do Diabetes	23
2.2	HIPERTRIGLICERIDEMIA	23
2.3	DISLIPIDEMIA DIABÉTICA NO DIABETES MELLITUS TIPO 2, CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES LIPOPROTEICAS	25
2.3.1	Efluxo do Colesterol	29
2.3.2	Via do Transporte Reverso do Colesterol	30
2.3.3	PLTP e CETP	31
2.3.4	Transferência de Lípidos no Diabetes Mellitus Tipo 2	31
2.3.5	Paraoxonase no Diabetes Mellitus Tipo 2	32
2.4	MENOPAUSA, DIABETES MELLITUS TIPO 2 E RISCO CORONARIANO	32
3.	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4.	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA	41
4.1.1	Crítérios e Exigibilidade	41
4.1.1.1	<i>Crítérios de Inclusão</i>	41
4.1.1.2	<i>Crítérios de Não Inclusão</i>	42
4.1.1.3	<i>Crítérios de Exclusão</i>	42
4.2	DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS.....	42
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS	46
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a *International Diabetes Federation* (IDF), existem 425 milhões de pessoas com diabetes mellitus (DM) no mundo, tornando-se um dos grandes problemas de saúde pública. De acordo com a mesma instituição, em 2045, 629 milhões de pessoas serão afetadas no mundo pelo DM, principalmente DM do tipo 2 (DM2), sendo que 80% desses indivíduos estarão vivendo em países em desenvolvimento (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2018; BRASIL, 2012, 2018) (Figura 1).

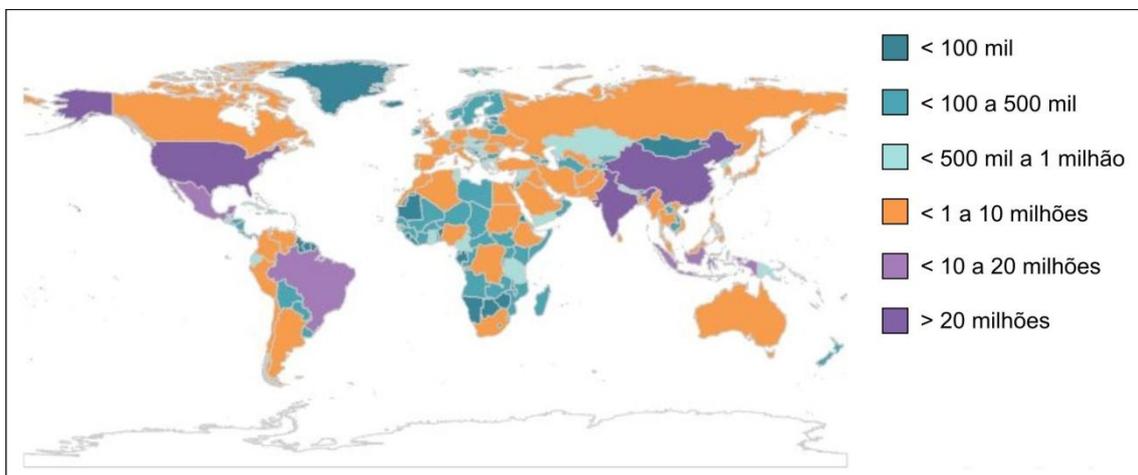


Figura 1. Pessoas com diabetes no mundo em 2017 (entre 20 e 79 anos para cada 1.000 habitantes) (dados estimados).

Fonte: IDF, 2018.

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) estima que cerca de 12 milhões de brasileiros sejam hoje portadores de DM, sendo que mais de 85% são portadores de DM2 (SBEM, 2018). Um aumento, segundo o Programa do Ministério da Saúde de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), de 61,8% nos últimos 10 anos, passando de 5,5% da população em 2006 para 8,9% em 2016. A pesquisa revelou também que as mulheres registraram crescimento significativo, passando de 6,3% para 9,9% no período, contra índices de 4,6% e 7,8% registrados entre os homens. O Brasil ocupa a quarta colocação entre indivíduos portadores de DM, estando atrás apenas da China, Índia e Estados Unidos, respectivamente, sendo

que a patologia figura hoje como a quinta causa de óbito no país (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

O envelhecimento e aumento da população, urbanização, falta de hábitos saudáveis, aumento da expectativa de vida do paciente diabético, obesidade, sedentarismo são responsáveis pelo aumento da prevalência do diabetes no Brasil e no mundo (WHO, 2016). Numerosos estudos mostraram a eficácia do controle de fatores de risco cardiovasculares individuais na prevenção ou desaceleração das doenças cardiovasculares e morbimortalidade relacionada a elas em pessoas com diabetes. Grandes benefícios são vistos quando vários fatores de risco são abordados simultaneamente. Há evidências de que as medidas do risco de doenças cardiovasculares realizadas nos EUA durante 10 anos em pacientes com diabetes tenham melhorado significativamente (ALI *et al.*, 2013) e que a morbimortalidade para doenças cardiovasculares diminuiu apesar de os Estados Unidos ainda ocuparem papel de destaque em população de diabéticos (BUSE *et al.*, 2007; GAEDE *et al.*, 2008; CDC, 2017, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017; ADA, 2018), diferentemente do que ocorre em países em desenvolvimento em que as mortes e o número de casos de diabetes têm aumentado, com a morbimortalidade voltada para fatores de risco como hipertensão, dislipidemia, sedentarismo, obesidade, tabagismo, história familiar de doença coronária prematura e presença de albuminúria (ADA, 2018).

A doença aterosclerótica cardiovascular (DAC) é a que ocupa destaque entre a morbimortalidade para portadores de diabetes (HERON, 2008; CASSAR, 2009; WHO, 2016) e seu aumento em países pobres e em desenvolvimento, como o Brasil, é fator de grande impacto para a saúde pública. Vale ressaltar, entretanto, que o fato de uma pessoa ter diabetes aumenta isoladamente o risco de apresentar doenças cardiovasculares em três a quatro vezes (LAAKSO, 2001), uma vez que fatores associados ao diabetes como dislipidemia, obesidade, hipertensão arterial sistêmica, insuficiência renal são multiplicadores do risco de doenças cardiovasculares e estão inter-relacionados, formando uma série de alterações que incorporam este risco (SVENSSON, 2014).

Vieira e colaboradores (2011) observaram que 18,4% (n=1.000, relatório PPSUS 2009/2010 Nº EFP_00001262/209) dos indivíduos participantes do estudo já podem ser considerados pré-diabéticos em função da glicemia de jejum alterada (100 a 125 mg/dL) e, mais grave ainda, é que desses, aproximadamente 25%

desenvolverão DM2 entre três a cinco anos, condição esta, sabidamente, fator de risco para desenvolvimento e progressão para DAC. Além disto, outros trabalhos revelam prevalência de 7 e 10% de hipertrigliceridemia isolada em homens (idade média 54 ± 12 anos) e mulheres (idade média 47 ± 8 anos) (VIEIRA *et al.*, 2011, VIEIRA, 2013). Na literatura vigente, pacientes pré-diabéticos e diabéticos, em sua grande maioria, já apresentam doença coronária precoce e são hipertrigliceridêmicos (SVIRIDOV, 2014; OIKAWA, 2015; GOODMAN *et al.*, 2015; RONSEIN *et al.*, 2015a, 2015b; CDC, 2017; SCHNEIDER *et al.*, 2017).

É importante frisar que os achados a respeito da hipertrigliceridemia direcionam para o remodelamento das partículas lipoproteicas de alta densidade (HDL) como fator preponderante para DAC, principalmente em pacientes diabéticos (DAC precoce), em virtude da falta de controle glicêmico nesses pacientes e no processo do transporte reverso do colesterol (NETTO *et al.*, 2014). Como a hiperglicemia é o ponto inicial das alterações metabólicas e multifatoriais no paciente diabético, uma vez que possui ação modificadora importante no endotélio vascular, local das transformações responsáveis pelo evento cardiovascular, seu controle e estudo são relevantes para o entendimento dessas alterações e sua prevenção.

O aumento acentuado do DM2 e complicações associadas à doença acompanham evidências crescentes de diferenças entre os sexos, dados clinicamente importantes. Efeitos genéticos e mecanismos epigenéticos, estilo de vida e fatores nutricionais afetam o risco das complicações do diabetes de maneira diferente em ambos os sexos. O DM2 possui uma característica importante e interessante quando comparada a outras doenças crônicas em relação ao sexo, uma vez que apesar de homens estarem mais propensos a desenvolverem DM2 e suas complicações cardíacas ao longo da vida, a doença é mais letal nas mulheres (FONSECA *et al.*, 2017).

Isto provavelmente ocorre em decorrência dos hormônios sexuais, tendo em vista o grande impacto no metabolismo energético, composição corporal, função vascular e respostas inflamatórias que estes exercem na mulher. Assim, os desequilíbrios endócrinos se relacionam com características cardiometabólicas desfavoráveis que podem ser facilmente observadas em mulheres com hipotireoidismo, síndrome de ovários policísticos e também em mulheres na menopausa (LAMON-FAVA *et al.*, 2006). Estudos realizados com mulheres

diabéticas menopausadas mostraram que a diminuição dos níveis de estrogênio ocorre mais rapidamente e mais cedo do que naquelas sem a doença e, por consequência, seus efeitos deletérios, principalmente no que se refere à DAC (FONSECA, 2017).

Além de mudanças rápidas nos níveis de estrogênio após a menopausa, o perfil lipídico da mulher DM2 na menopausa apresenta diferenças significativas quando comparadas àquelas DM2 não menopausadas, com níveis de HDL mais baixos, LDL normal ou elevado e, mais significativo, aumento dos triglicerídeos (TG) (GIBRIELA, 2007), uma vez que é a presença precoce da hipertrigliceridemia que mais está direcionada à DAC nas mulheres menopausadas (ANAGNOSTIS *et al.*, 2015).

Fatores endócrinos estão envolvidos na morbimortalidade em mulheres DM2 menopausadas, principalmente DAC e nefropatias, entretanto, o estudo das alterações das lipoproteínas de alta densidade, a hiperglicemia continuada e a hipertrigliceridemia são fundamentais para elucidar como seu comportamento pode contribuir para o desenvolvimento dessas complicações e assim promover meios de proteção para mulheres nessa condição.

Este anteprojeto de pesquisa faz parte do racional submetido como aditivo do termo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia – CEP/MCO/UFBA, ofício nº 379, ref. V/Of. nº 02/2005, 27.09.05, depois de atendidas as recomendações contidas no Parecer/Resolução nº 103/2005, o estudo foi consecutivamente estendido conforme pareceres e resoluções aditivas nº 075/2011; nº 054/2012 e nº 029/2014 até junho de 2016 (Anexo 1). Este estudo contou com a cooperação do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor-HCFMUSP-SP e do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (LACTFAR/UFBA), parceiros para o desenvolvimento deste estudo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DIABETES: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA) (2018), o diabetes mellitus (DM) é uma patologia de etiologia múltipla e pode ser classificado nas seguintes categorias gerais:

- a) Diabetes mellitus tipo 1 (destruição autoimune das células beta, geralmente levando a absoluta deficiência de insulina);
- b) Diabetes mellitus tipo 2 (perda progressiva da secreção de insulina por células beta frequentemente relacionada a resistência à insulina);
- c) Diabetes mellitus gestacional (diabetes diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre da gravidez sem diabetes antes da gestação);
- d) Tipos específicos de diabetes devido a outras causas, por exemplo, defeitos genéticos da função da célula β ; defeitos genéticos da ação da insulina; doenças do pâncreas exócrino; endocrinopatias; indução por drogas ou produtos químicos; infecções; formas incomuns de diabetes imunomediada.

O diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 são doenças heterogêneas nas quais a apresentação clínica e a progressão da doença podem variar consideravelmente. Apesar de a classificação ser importante para determinar a terapia, alguns indivíduos não podem ser claramente classificados como com diabetes tipo 1 ou tipo 2 no momento do diagnóstico. Os paradigmas tradicionais de que diabetes tipo 2 ocorrem apenas em adultos e diabetes tipo 1 apenas em crianças não são mais precisos (SKYLER *et al.*, 2016). Desta forma, em outubro de 2015, a ADA, a Associação Européia para o Estudo do Diabetes e a Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos fizeram a diferenciação por fisiopatologia, história natural e pesquisa de prognóstico (INSEL *et al.*, 2015)

O DM pode ser caracterizado por hiperglicemia crônica, seja pela falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer de forma adequada sua atividade, apresentando distúrbios do metabolismo dos lipídios, carboidratos e proteínas (KOREN-GLUZER *et al.*, 2011; ADA, 2018). Assim, o DM não é uma única doença, mas um conjunto heterogêneo de distúrbios metabólicos que

apresenta em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou de ambas, sendo considerada uma condição metabólica que gera estresse oxidativo nos tecidos corpóreos, em particular, nas paredes dos vasos, causando alterações como aterosclerose e complicações vasculares que levam à DAC (SVENSSON *et al.*, 2014).

2.1.1 Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)

O DM2 corresponde a 80-95% de todo diabetes existente. O número de indivíduos com DM2 dobrou nas últimas décadas, tornando-se um problema grave de saúde pública (WHITING, 2011; FARBSTEIN, 2012; PASTERKAMP, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017; SBEM, 2018; ADA, 2018).

O DM2 pode ser caracterizado por defeitos na atividade da insulina e/ou na sua secreção e, assim, na regulação da produção hepática de glicose. De uma maneira geral, o defeito na função das células beta já está presente na fase pré-clínica da doença, assim como a resistência à insulina, que acaba não sendo suficiente para controlar a produção de glicose pelo fígado ou promover formação da glicose pelo músculo esquelético (PATEL *et al.*, 2007; ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2018; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2017).

Várias causas podem estar relacionadas ao desenvolvimento de DM2, contudo, estudos indicam uma forte correlação com sobrepeso e fatores genéticos; valendo ressaltar que muitos pacientes ficam subdiagnosticados por anos, pois a hiperglicemia desenvolve-se de forma insidiosa (ADA, 2018; AMARAL, 2015). As alterações lipídicas mais comuns no DM2 são a hipertrigliceridemia, a redução do colesterol HDL e, por vezes, o aumento do colesterol LDL (WILSON *et al.*, 1988).

O DM2 está relacionado ao aumento da morbimortalidade para DAC, sendo considerado importante fator de risco (HAFFNER *et al.*, 1998; PASTERKAMP, 2013; RAWSHANI *et al.*, 2017). O processo que desencadeia a aterosclerose em pacientes diabéticos e não diabéticos é semelhante, entretanto estudos indicam que pacientes com DM2 têm uma progressão mais rápida e difusa da doença (PATEL *et al.*, 2007; PASTERKAMP, 2013; ZANNAD, 2015). No DM2, normalmente a resistência à insulina leva à redução do catabolismo dos quilomícrons e VLDL, seguido do aumento da produção hepática de TG e LDL,

entretanto, as alterações na densidade, produtos de glicação formados e processos de oxidação desta partícula, acabam por torná-la muito mais aterogênica no indivíduo diabético, levando ao maior risco de DAC nesses indivíduos (TOMKINS e OWENS, 2017).

2.1.2 Diagnóstico do Diabetes

De acordo com os critérios atuais adotados pela Associação Americana de Diabetes (ADA) (2018), o diagnóstico do diabetes pode ser feito de acordo com o que se descreve na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Critérios diagnósticos para diabetes.

Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL (7,0mmol/L). O jejum é definido quando não há ingestão calórica por pelo menos 8 h.*
OU
2-h Glicemia ≥ 200 mg/dL (11,1mmol/L) com o Teste de Tolerância à Glicose (TTG). O teste deve ser realizado conforme descrito pela OMS, utilizando solução com carga de glicose a 25%, ou seja, contendo o equivalente a 75g de glicose ainda dissolvida em água.*
OU
A1C $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol).
OU
Em paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica com glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL (11,1mmol/L).

* Na ausência de hiperglicemia inequívoca, os resultados devem ser confirmados por testes repetidos.

Fonte: ADA (2018).

2.2. HIPERTRIGLICERIDEMIA

O *National Cholesterol Education Program* (NCEP) (NIH, 2001) definiu a hipertrigliceridemia como TG acima de 150mg/dL e revela que é a segunda anormalidade lipídica mais comum em pacientes dislipidêmicos, sendo uma das mais preocupantes para pacientes diabéticos pelas consequências trazidas ao longo dos anos, como maior risco de DAC (FEITOSA-FILHO, 2008; JELLINGER *et al.*, 2017)

Vários estudos sugerem que a hipertrigliceridemia juntamente com o metabolismo das lipoproteínas, principalmente as remanescentes, aumentam o

risco de DAC, pelo seu papel aterogênico (FRYIRS *et al.*, 2010; SIEBEL, 2013; ASLAM *et al.*, 2016; FEMLAK *et al.*, 2017). Entretanto, estudos também reforçam que indivíduos com TG aumentado apresentam risco independente para DAC (ASLAM *et al.*, 2016; JELLINGER *et al.*, 2017). Jacobson e colaboradores (2007), em uma meta-análise de 21 estudos prospectivos de base populacional, chegaram à conclusão de que a concentração plasmática de TG é um fator de risco independente para DAC. Assim como, trabalhos realizados por Murad e colaboradores em 2012 e Karlson e colaboradores em 2016 apresentaram resultados semelhantes, indicando padrão de risco elevado para DAC em indivíduos com hipertrigliceridemia, principalmente em pacientes diabéticos (NORDESTGAARD e VARBO, 2014).

Como os níveis elevados de TG estão associados ao aumento do risco de doença cardiovascular (NORDESTGAARD e VARBO, 2014; KARLSON, 2016), a redução do colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) permanece o objetivo principal do tratamento, mesmo em pacientes com hipertrigliceridemia leve (TG de 177mg/dL (2,0mmol/L), como definido pelo Consenso da Sociedade Europeia de Aterosclerose (CATAPANO *et al.*, 2011).

De acordo com Nordestgaard e Varbo (2014), como os TG podem ser degradados pela maioria das células, mas não o colesterol, então o colesterol rico em TG (lipoproteínas remanescentes) é provavelmente a causa da aterosclerose e doença cardiovascular ao invés dos TG elevados por si sós. De fato, é o colesterol e não os triglicérides que se acumulam na íntima das células espumosas e em placas ateroscleróticas, e isto ocorre porque as lipoproteínas remanescentes com origem no metabolismo das VLDL, β -VLDL e quilomícrons, após ação das lipase lipoproteica e lipase hepática levarão à formação da LDL pequena e densa (LDLpd), a mais aterogênica e citotóxica das lipoproteínas e as que são absorvidas diretamente por macrófagos, levando à formação de células espumosas (FEITOSA-FILHO, 2009). Assim, como nos diabéticos a LDL apresenta meia vida plasmática aumentada, uma vez que sua afinidade por receptores no fígado está diminuída, faz com que a mesma se torne menor e mais densa, suscetível à glicação, oxidação, maior captação pelos macrófagos, maior produção de radicais livres e maior potencial para dano endotelial e para a formação da placa aterosclerótica (VERGÊS, 2015).

2.3. DISLIPIDEMIA DIABÉTICA NO DIABETES MELLITUS TIPO 2, CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES LIPOPROTEICAS

A dislipidemia está relacionada a fatores genético-ambientais, nutricionais e normalmente já está presente no momento do diagnóstico da hiperglicemia nos indivíduos com DM2 (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Etiologicamente, a dislipidemia pode ser classificada como primária e secundária, sendo a primária de ordem genética, relacionada a uma desordem da síntese e degradação de lipídios. A dislipidemia secundária pode estar relacionada a vários fatores, dentre os quais: DM2, uso de medicamentos, obesidade e demais outros que podem levar a uma alteração dislipidêmica temporária ou permanente (SANTOS, 2014).

Anormalidades do metabolismo lipídico estão entre os principais fatores que contribuem para o risco de DAC em pacientes com DM2. A dislipidemia diabética em pacientes DM2 apresenta alta prevalência 72-85% e inclui não apenas anormalidades lipoproteicas quantitativas, mas também qualitativas e da cinética das lipoproteínas que, juntas, resultam em mudança para um perfil lipídico mais aterogênico (DOUCET *et al.*, 2012; VERGÈS, 2015).

Vários fatores podem contribuir para as mudanças no metabolismo lipídico em pacientes com DM2, incluindo resistência à insulina e / ou relativa deficiência de insulina, adipocitocinas (por exemplo, adiponectina) e hiperglicemia (TASKINEN, 2003; CHAHIL e GINSBERG, 2006; VERGÈS, 2005). Assim, podem-se caracterizar as anormalidades dislipidêmicas em pacientes DM2 em quantitativas e qualitativas. Aquelas quantitativas em pacientes dislipidêmicos com DM2 normalmente relacionam-se à hipertrigliceridemia, aumento dos níveis de partículas remanescentes, relacionado ao aumento da produção de lipoproteínas ricas em TG e uma redução na taxa de catabolismo de lipoproteínas ricas em TG, e diminuição sérica do HDL (VERGÈS, 2015).

Já as anormalidades lipoproteicas qualitativas incluem o aumento da subfração de lipoproteínas de elevada densidade e muito baixa densidade (VLDL1) e LDL pequenas e densas, bem como o aumento do TG nas LDL e HDL, glicação de apolipoproteínas e aumento da susceptibilidade do LDL à oxidação. A principal anormalidade cinética é o aumento da produção de VLDL1, diminuição do catabolismo de VLDL e aumento do catabolismo de HDL. Além disso, embora os níveis de LDL sejam tipicamente normais em pacientes DM2, as partículas de LDL

apresentam maior tempo de permanência plasmática, o que as impede de retornar ao fígado, como as partículas pequenas e densas de LDL (LDLpd), ricas em triglicérides, também conhecidas como subclasse B/E, em que há uma diminuição dos receptores no fígado, LDL oxidadas (LDL-ox) e LDL glicadas, o que as tornam potencialmente aterogênicas (Tabela 2) (FEITOSA-FILHO, 2008; VERGÈS, 2015).

Tabela 2. Alterações importantes no metabolismo de lipoproteínas no DM2.

Lipoproteínas	Alterações quantitativas	Alterações qualitativas	Alterações metabólicas
Quilomícron	Aumento da concentração no plasma	Poucos dados disponíveis	Aumento da produção e diminuição do catabolismo
VLDL	Aumento da concentração no plasma	Maior proporção de partículas grandes (VLDL1) Glicação	Aumento da produção e diminuição do catabolismo
LDL	Sem alterações ou levemente aumentada sua concentração no plasma	Maior proporção de partículas pequenas e densas, ricas em TG Aumento da oxidação Glicação	Diminuição do catabolismo
HDL	Diminuição da concentração no plasma	Aumento de TG Redução de fosfolipídios, ApoE e ApoM Glicação	Aumento do catabolismo

Está estabelecido que as HDL possuem múltiplas atividades antiaterogênicas, incluindo efluxo de colesterol celular dos tecidos periféricos para o fígado para excreção no processo de transporte reverso do colesterol, juntamente com suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antiapoptóticas, antitrombóticas e vasodilatadoras (ASSMANN *et al.*, 2003; KONTUSH *et al.*, 2006).

O metabolismo da HDL é substancialmente alterado no DM2, sendo que a hipertrigliceridemia é um dos principais responsáveis pelo catabolismo da HDL, levando a níveis abaixo do normal (LEWIS e RADER, 2005; KONTUSH e CHAPMAN, 2008). Primeiro, as partículas pequenas de HDL, resultantes em parte da lipólise intravascular de HDL enriquecidas com TG, são eliminadas mais rapidamente da circulação; segundo, as HDL enriquecidas com TG são intrinsecamente mais instáveis na circulação, com a ApoA-I fracamente ligada. Além disso, a lipólise da HDL enriquecida com TG resulta em menor número de

partículas HDL, uma vez que a ApoA-I é perdida e sua remoção na circulação é acelerada. A disfunção na lipoproteína lipase (LPL) ou sua atividade reduzida também contribui para a diminuição dos níveis de HDL através da redução da disponibilidade dos constituintes das lipoproteínas ricas em TG que normalmente sequestram para o *pool* plasmático das partículas nascentes de HDL (KONTUSH e CHAPMAN, 2008).

O metabolismo da HDL é fortemente influenciado pela atividade da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP). No DM2, a atividade elevada da CETP resulta na alteração da transferência de colesterol esterificado (CE) de HDL para lipoproteínas ricas em TG e vice-versa, produzindo HDL enriquecida com TG, juntamente com o enriquecimento de CE nas partículas de VLDL e remanescentes (LE GOFF *et al.*, 2004).

Como já abordado, muitas das anormalidades lipídicas observadas em pacientes DM2 existem antes do início do diabetes como parte da síndrome metabólica resistente à insulina, que se caracteriza pelo acúmulo de lipoproteínas ricas em TG, partículas pequenas e densas de LDL e diminuição de HDL no plasma. Essas anormalidades lipídicas são conhecidas por promover doença cardiovascular em indivíduos com DM2 (GRUNDY *et al.*, 2004). Isso enfatiza o importante papel da resistência à insulina na fisiopatologia da dislipidemia diabética (VERGÈS, 2015; ADA, 2018).

As Figuras 2 e 3 apresentam de forma didática essas alterações lipídicas no processo de formação da placa aterosclerótica, com ênfase na participação da LDL e HDL.

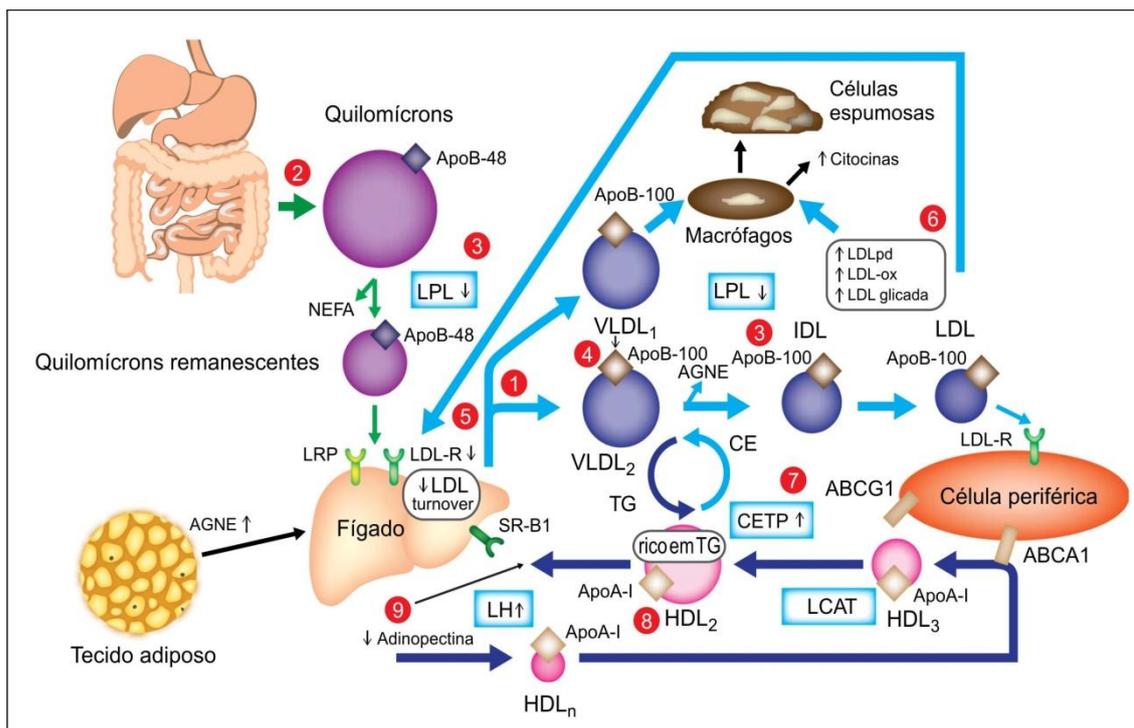


Figura 2. Principais anormalidades lipídicas no diabetes mellitus tipo 2.

Triglicérides (hipertrigliceridemia, alterações cinéticas e qualitativas): (1) aumento da produção de VLDL, principalmente VLDL₁; (2) aumento da produção de quilomíons; (3) redução do catabolismo de VLDL e quilomíons (diminuição da atividade da LPL); (4) aumento em grande quantidade da partícula VLDL (VLDL₁), preferencialmente absorvidos por macrófagos; LDL (alterações cinéticas e qualitativas): (5) redução do retorno de LDL ao fígado em decorrência da diminuição dos receptores B/E para LDL; (6) aumento do número de LDL glicadas, LDL pequenas e densas (ricas em TG) e LDL oxidadas, que são preferencialmente absorvidas por macrófagos; HDL (alterações cinéticas e qualitativas): (7) aumento da atividade da CETP (aumento da transferência de TG de lipoproteínas ricas em TG para LDL e HDL); (8) aumento de TG nas HDL promovendo atividade da lipase hepática e catabolismo da HDL; (9) diminuição da adinopectina plasmática favorecendo o aumento do catabolismo da HDL. Ésteres de colesterol (CE); proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP); LDL pequena e densa (LDLpd); HDL nascente (HDL_n); lipase hepática (HL); lipase hormônio sensível (HSL); lipoproteína lipase (LPL); receptor de LDL (LDL-R); receptor scavenger B1 (SR-B1); triglicérides (TG); ácido graxo não esterificado (NEFA/AGNE).

Fonte: VERGÈS (2015) (traduzido).

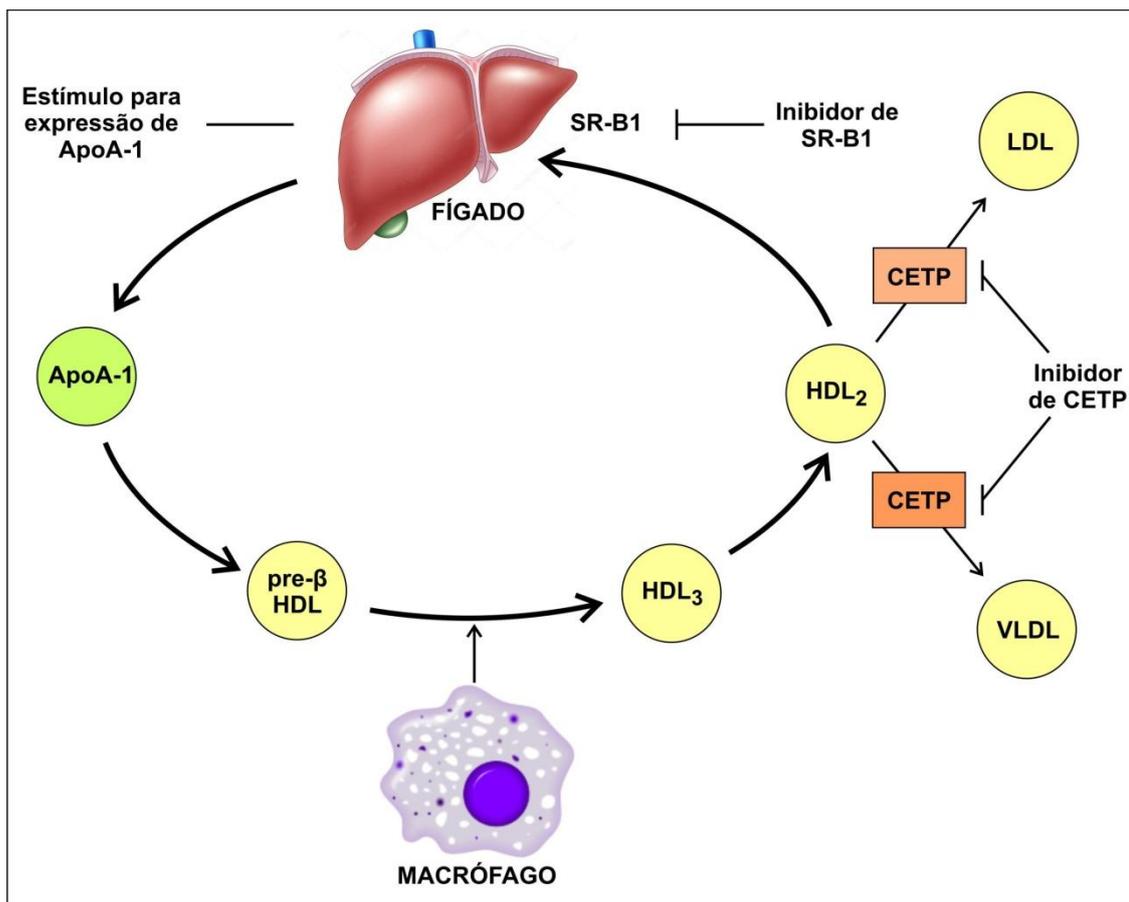


Figura 3. Formação da lipoproteína de alta densidade (HDL).

A formação de partículas de lipoproteínas de alta densidade (HDL nascente) começa com a síntese de apolipoproteína A-I (ApoA-I) no fígado. Estas moléculas de ApoA-I começam então a receber colesterol e fosfolípidios de macrófagos a partir do efluxo mediado pelo transportador cassete de membrana via ligação ATP (ABC - *ATP-binding membrane cassette*), enriquecendo a molécula de HDL, formando a pre-beta-HDL. A inibição da transferência de éster de colesterol da HDL3 resultante (partículas menores e mais densas) e da HDL2 (partículas maiores e menos densas) a partir da inibição da CETP pode ser bloqueada pelos inibidores da CETP. A inibição da captação de colesterol da HDL pelo fígado e macrófagos se dá a partir da ação de inibidores do receptor de eliminação BI (SR-B1) o que também pode levar a níveis elevados de colesterol da HDL (HDL-C). Apolipoproteína A-I: ApoA-I; Proteína de transferência de colesterol esterificado: CETP; Lipoproteína de alta densidade: HDL; Receptor scavenger B1: SR-B1.

Fonte: BRUNZELL e FAILOR, 2010 (adaptado).

2.3.1 Efluxo do Colesterol

As alterações na composição, remodelamento e metabolismo da HDL, como ocorre na dislipidemia e inflamação diabéticas, estão intimamente ligadas a atividades biológicas prejudicadas. A ApoA-I isolada (CAVALLERO *et al.*, 1995) e no plasma total (SYVANNE *et al.*, 1996) de pacientes DM2 apresentam diminuição do efluxo de colesterol celular quando comparados com controles saudáveis (KONTUSH e CHAPMAN, 2008). Similarmente, na hipertrigliceridemia primária associada a baixos níveis de HDL, cujo colesterol intrínseco das células Fu5AH do

fígado estão comprometidas, as partículas de HDL enriquecidas com TG acumulam-se e a capacidade de efluxo do colesterol está igualmente reduzida (BRITES *et al.*, 2000; SPRANDEL *et al.*, 2015).

A glicação pode modificar os resíduos de aminoácidos de ApoA-I e, como consequência, pode diminuir o efluxo de colesterol mediado por HDL e ApoA-I. Além disso, a glicação da HDL reduz igualmente sua capacidade de promover o efluxo de colesterol (HOANG *et al.*, 2007). Parece que a substituição de CE por TG no núcleo lipídico da HDL constitui um mecanismo chave envolvido na deficiência da capacidade de efluxo de colesterol da HDL no DM2. Tal modificação composicional altera a conformação da ApoA-I, que é crítica para a interação do receptor de HDL (WEIBEL *et al.*, 2014). Além disso, a substituição de CE por TG na HDL esférica reconstituída diminui a estabilidade conformacional de ApoA-I, resultando em partículas contendo TG que são instáveis e que perdem ApoA-I após o armazenamento (LAVERDY *et al.*, 2015).

A capacidade de efluxo de colesterol também pode ser prejudicada como consequência da inflamação (WEIBEL *et al.*, 2014). Finalmente, a modificação oxidativa representa outro fator envolvido na atenuação da capacidade de efluxo de colesterol da HDL. A oxidação *in vitro* da ApoA-I pela mieloperoxidase resulta na inibição seletiva do efluxo de colesterol dependente de ABCA1 dos macrófagos. Paralelamente, a capacidade de ligação lipídica da ApoA-I é progressivamente prejudicada (SHAO *et al.*, 2006).

2.3.2 Via do Transporte Reverso de Colesterol

De acordo com estudos, a principal ação antiaterogênica da partícula de HDL é remover o colesterol das células dos tecidos periféricos no intuito de auxiliar a homeostase do colesterol das células, e isto ocorre principalmente através do transporte reverso do colesterol (RCT), em que o excesso de colesterol celular é removido das células periféricas pela HDL, que volta ao fígado para reabsorção ou excreção pela bile (FORTI e DIAMENT, 2006; LIMA e COUTO, 2006). E nessa remoção dos tecidos periféricos, o colesterol é continuamente removido e transportado ao fígado, onde será excretado na bile para posterior eliminação intestinal, efeito esse que explica a ação antiaterogênica da HDL (LEANCA *et al.*, 2010; FISHER *et al.*, 2012).

2.3.3 PLTP e CETP

As anormalidades lipoprotéicas qualitativas observadas em pacientes com DM2, como aumento do conteúdo de TG e alterações principalmente nas partículas de LDL e HDL, indicam aumento da atividade da CETP (BARTER e RYE, 2012). O principal fator responsável pelo aumento da atividade da CETP no DM2 é o aumento do *pool* de lipoproteínas ricas em TG (principalmente VLDL), que diretamente estimulam a CETP. No entanto, a hiperglicemia por si só também ativa a CETP, uma vez que a glicação de lipoproteínas aumenta a atividade da CETP. Além disso, um estudo em pacientes com diabetes demonstrou que a glicação da ApoC-I reduz o efeito inibitório da CETP. O aumento da atividade de PLTP também foi relatado em pacientes DM2, e isso está associado ao aumento da espessura da íntima dos vasos (BOUILLET *et al*, 2014; VERGÈS, 2015).

2.3.4 Transferência de Lípidos no Diabetes Mellitus Tipo 2

As transferências de lipídios entre as classes de lipoproteínas são bidirecionais e dependem da estrutura e concentração no plasma do doador e da lipoproteína receptora, bem como da ação das proteínas de transferência. Diante disto, uma vez que a transferência de lipídios tem um papel fundamental no metabolismo da HDL plasmática, remodelando constantemente a lipoproteína e, portanto, interferindo nos seus vários aspectos funcionais, Maranhão e colaboradores (1993) e Ginsburg e colaboradores (1982) desenvolveram um método em que se avalia simultaneamente as transferências dos principais lipídios (éster de colesterol, fosfolípidos, triglicérides e o colesterol não esterificado) contidos nas lipoproteínas para a HDL, utilizando uma nanopartícula lipídica artificial similar à LDL (LDE). A utilização dessa nanopartícula artificial é crucial para o melhor entendimento do processo de transferência de lipídios, assim como a ação de proteínas de transferências (CETP e PLTP) (FEITOSA-FILHO, 2008; SPRANDEL, 2013).

A transferência lipídica entre as lipoproteínas pode estar relacionada à quantidade de cada classe e subclasse de lipoproteínas, já que as mesmas podem ser dependentes das colisões entre essas partículas lipoproteicas e, por isso, o efeito de massa venha a ter relevante participação. A própria estrutura lipídica e proteica das lipoproteínas podem alterar a sua fluidez e atuar nesse mecanismo de troca; além disso, a presença e concentração de outras proteínas plasmáticas

também podem interferir nessas transferências lipídicas (FEITOSA-FILHO, 2008). Entretanto, estudos têm demonstrado que, em pacientes DM2, a HDL tem sua capacidade de transferência de lípidos prejudicada (PUSSINEN *et al.*, 2001; BORGGREVE *et al.*, 2003; DIDICHENKO *et al.*, 2016; VAZIRI, 2016).

2.3.5 Paraoxonase no Diabetes Mellitus Tipo 2

Os níveis e atividades das enzimas associadas à HDL, incluindo a paraoxonase 1 (PON-1), fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase (PAF-AH) e lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), podem estar alterados no DM2.

A paraoxonase / aril-esterase (PON-1) é uma enzima que tem relação direta no metabolismo do colesterol, uma vez que circula no plasma associada à HDL, com atividade antioxidante e, conseqüentemente, antiaterosclerótica (COSTA *et al.*, 2005; LIMA e COUTO, 2006; SHEKHANAWAR *et al.*, 2013). A sua ação está ligada à inibição da peroxidação da LDL e da diferenciação de monócitos em macrófagos, para que as células espumosas não sejam produzidas e, por consequência, a placa aterosclerótica (NAVAB *et al.*, 2004). Desta forma, a paraoxonase previne a oxidação da lipoproteína de baixa densidade, apresentando efeito antiaterogênico (IKEDA *et al.*, 2009; BANSAL *et al.*, 2013).

Em razão da glicação proteica que ocorre em pacientes diabéticos, a ação enzimática da PON-1 estará reduzida, assim como a sua concentração em massa. E isto ocorre porque o processo de glicação produz espécies reativas de oxigênio (ERO) que acaba por reduzir ou inativar a atividade da PON-1 nesses pacientes (VIEIRA, 2013; MOGAREKAR *et al.*, 2013, 2016).

2.4 MENOPAUSA, DIABETES MELLITUS TIPO 2 E RISCO CORONARIANO

Algumas definições prévias são importantes para o entendimento da relação da menopausa e DM2. A Organização Mundial de Saúde (OMS-WHO) (2002) define o climatério como a fase biológica que compreende a transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo da vida da mulher, ou melhor, o fim da fase reprodutiva e o início da senectude (40 a 65 anos de idade). A menopausa é um marco dessa fase, correspondendo ao último ciclo menstrual, somente reconhecida

depois de passados 12 meses da sua ocorrência e ocorre geralmente em torno dos 48 aos 50 anos de idade (WHO, 2002; FIGUEIREDO NETO *et al.*, 2010; CHANDRASEKHAR, 2016) (Figura 4). Durante o climatério, existe uma série de alterações hormonais, com progressiva redução de hormônios ovarianos, em especial do estrogênio e da progesterona, resultando em modificações substanciais que, por vezes, resultam em alterações físicas e psíquicas importantes para a qualidade de vida da mulher (WHO, 2002).

O climatério ainda possui as fases de pré, perimenopausa e pós-menopausa. A pré-menopausa é caracterizada por períodos em que a mulher ainda apresenta ciclos menstruais, mas de forma irregular (FIGUEIREDO NETO *et al.*, 2010; FEBRASGO, 2010). A perimenopausa ou transição menopausal é o período que tem início dois anos antes da última menstruação, estendendo-se até um ano após o não aparecimento menstrual natural. Durante este período as mulheres apresentam ciclos menstruais irregulares e alterações endócrinas (FIGUEIREDO NETO *et al.*, 2010). É importante ressaltar que a transição menopausal e a pré-menopausa por vezes se sobrepõem (GIRIBELA, 2007). A pós-menopausa é definida então pelo período iniciado um ano após a última menstruação da mulher (FIGUEIREDO NETO *et al.*, 2010; WHO, 2002).

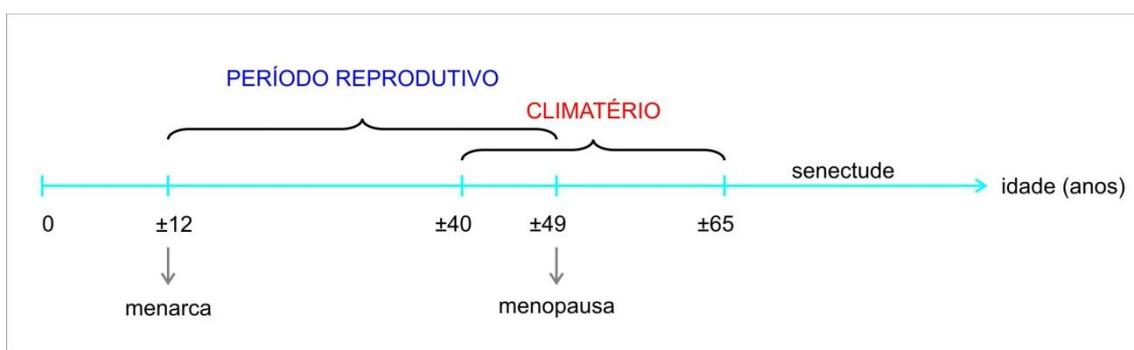


Figura 4. Ciclo de vida reprodutiva da mulher.

Fonte: Febrasgo (2010) (adaptado).

Mudanças metabólicas são comuns em mulheres no climatério e a diminuição considerável nos níveis de estrogênio predispõe o organismo feminino ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que resulta em aumento do estresse oxidativo e, independente de associação com o diabetes, o

envelhecimento na mulher está relacionado a alta de TG, colesterol total, aumento da gordura abdominal, aumento de LDL-c e redução do HDL-c, principalmente da fração HDL2, podendo essas alterações contribuir para tornar o perfil lipídico mais aterogênico independente da presença do diabetes (GIRIBELA, 2007; GENSCHEL, 2009; FEITOSA-FILHO, 2009). Ushiroyama (2005), entretanto, avaliou a influência da menopausa na relação HDL2 / HDL3 em associação com hipertrigliceridemia. E os resultados indicaram que o estado da menopausa não só aumenta os níveis plasmáticos de colesterol LDL e TG, como também aumenta a proporção HDL2 / HDL3 quando associada à elevação dos níveis plasmáticos de TG. Estas alterações, aliadas ao DM2, aumentam mais os danos oxidativos já característicos de portadores de DM2 (SULZBACHER *et al.*, 2017). A Tabela 3 resume as principais características das anormalidades estruturais e funcionais do metabolismo lipídico durante o processo aterogênico, considerando ainda o impacto do DM2 aliado às mudanças fisiológicas associadas ao envelhecimento da mulher.

Estudos revelam que o estrogênio protege contra a formação de espécies reativas do oxigênio, por desempenhar papel antioxidante e aterogênico-protetor (SANTO *et al.*, 2006), e mostram que quanto maior o tempo de menopausa, maiores são os níveis de lipoperoxidação, caracterizando maior dano oxidativo (SANTO *et al.*, 2001). Além disto, os estrogênios apresentam ações genômicas, como o remodelamento das lipoproteínas, que têm duração prolongada (TOSTES *et al.*, 2003), com especial atenção para maior estímulo na síntese hepática de TG, aumento na produção e secreção de VLDL; aumento na síntese dos receptores de LDL, o que favorece o catabolismo da LDL; inibição da síntese da lipase hepática, diminuindo sua atividade, o que resulta em elevação na concentração da HDL (TIKKANEN *et al.*, 1998); estímulo na produção de ApoA-I e inibição da síntese de receptor “*scavenger*” classe B tipo 1 (SR-B1), causando aumento na concentração de HDL; inibição da síntese da lipoproteína lipase (LPL) no tecido adiposo abdominal, reduzindo o depósito de TG nesta região e atividade antioxidante, diminuindo a oxidação da LDL (BERG *et al.*, 2001).

Tabela 3. Principais características das anormalidades estruturais e funcionais do metabolismo lipídico durante o processo aterogênico, considerando ainda o impacto do DM2 aliado às mudanças fisiológicas associadas ao envelhecimento da mulher.

Item	Mulheres na pré-menopausa	Mulheres na pós-menopausa	Mulheres diabéticas na pós-menopausa
Níveis de risco cardiovascular	Médio	Alto	Muito alto
Incidência cardiovascular	1 mulher: 3-10 homens Maior chance de fatalidade após eventos coronarianos	Semelhante à mulher na pré-menopausa até os 65 anos e maior para a idade de 75 anos	Quase sem diferença entre os sexos em relação à morbimortalidade
Placa	Núcleos lipídicos menores, menos cálcio, menos componentes inflamatórios e desenvolvimento lento de placas vulneráveis	Padrão clássico de ruptura seguido por trombose	Padrão clássico de ruptura seguido por trombose
Análise do perfil lipídico tradicional	Pode ser normal mas progredindo para o perfil das mulheres na pós-menopausa	Aumento: - Colesterol total - LDL-c - TG - ApoB Diminuição: - HDL-c - HDL-c/CT - ApoA-I/ApoB	Aumento: - Colesterol total - LDL-c - TG - ApoB - Secreção hepática de VLDL Diminuição: - HDL-c - HDL-c/CT - ApoA-I/ApoB
Subfrações de lipoproteínas	Pode ser normal mas progredindo para o perfil das mulheres na pós-menopausa	Aumento: - LDL pequena e densa Diminuição: - LDL maior e mais flutuante - Receptor de LDL hepático - Partículas grandes de HDL	Aumento: - LDL pequena e densa - Partículas menores de HDL Diminuição: - LDL maior e mais flutuante - Partículas grandes de HDL - Quilomícrons e clearance da VLDL

De acordo com Kumawat e colaboradores (2012), a constância da hipertrigliceridemia em pacientes DM2 é uma das causas do aumento de radicais livres do oxigênio, levando a um estresse oxidativo e maior liperoxidação, sendo este o fator principal para a predisposição das complicações cardiovasculares oriundas da diabetes. Uma vez que o estrogênio previne o estresse oxidativo, sendo um potente antioxidante, as mulheres na menopausa estariam mais predispostas a eventos cardiovasculares e complicações da DM2 do que aquelas não menopausadas, uma vez que o estrogênio confere um estado protetor contra DAC. Desta forma as mulheres na menopausa tendem a apresentar dislipidemias com o aumento dos níveis séricos de TG (GASPARD *et al.*, 2009; GIRIBELA 2007; WENGER, 2008; BUSHNELL *et al.*, 2014; BOARDMAN e HARTLEY, 2015), o que em pacientes DM2 acarretam maior risco para DAC.

Portanto, conforme o tempo de menopausa e DM2, aumentam também o nível de peroxidação lipídica e o risco de ocorrência de dano oxidativo, condição agravante para a disfunção metabólica e estresse oxidativo, que levará à disfunção endotelial e deposição de placas de ateroma (SANTO *et al.*, 2001; SULZBACHER *et al.*, 2017).

Algumas evidências indicam que a terapia de reposição hormonal durante o climatério consegue reverter estes achados, uma vez que os hormônios femininos, a princípio, protegem contra o risco coronariano (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Entretanto, o *Women's Health Initiative Study* demonstrou que a terapia oral combinada de estrogênio e progesterona não protegeu as mulheres contra DAC e, em realidade, acabou produzindo efeitos colaterais graves como derrame cerebral e danos isquêmicos (FAVA *et al.*, 2006; PEPITRIAL, 1995).

The *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES, 2016) descreveu que o estrogênio desempenha um papel importante na manutenção de níveis adequados de HDL. De acordo com a Diretriz Brasileira de Diabetes (2017-2018), a terapia de reposição hormonal (TRH) após a menopausa pode reduzir o colesterol LDL (LDL-c) em até 20-25% e aumentar o colesterol HDL (HDL-c) em até 20%. Porém, esta terapêutica não é recomendada no intuito de reduzir o risco cardiovascular em mulheres na menopausa (FAVA *et al.*, 2006; PEPITRIAL, 1995).

Nas mulheres, com indicações ginecológicas para a TRH (controle de sintomas vasomotores e osteoporose), pode haver benefício cardiovascular quando iniciada na transição menopáusicas ou nos primeiros anos de pós-menopausa

("janela de oportunidade") (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Todavia, ainda pode haver aumento do risco quando a TRH é iniciada, pois a terapia deve ser evitada nas mulheres de alto risco ou naquelas já com a menopausa por mais de 02 anos. Em mulheres DM2, a TRH deve ser evitada pelo próprio risco para DAC que o diabetes apresenta, sendo apenas recomendada quando os benefícios superarem os riscos (PEPITRIAL, 1995).

Em relação ao sexo, as mulheres apresentam menor incidência de infarto e demais doenças cardiovasculares antes da menopausa do que os homens, estando ambos na mesma faixa etária (BRUNZELL e FAILOR, 2010; SARRAFZADEGAN *et al.*, 2013). Após a menopausa, entretanto, algumas mulheres desenvolvem síndrome metabólica, ou demais alterações isoladas, como dislipidemias, hipertrigliceridemia, hipertensão arterial e DM2 que progridem para uma piora dos índices de DAC quando comparados com o sexo masculino (BRUNZELL e FAILOR, 2010, SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017), lembrando que síndrome metabólica (SM), de acordo com os critérios do Programa Nacional de Educação em Colesterol - III Painel de Tratamento de Adultos (*National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III - NCEP-ATP III*) e da Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation - IDF*) é um transtorno representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular relacionados à deposição central de gordura abdominal, resistência insulínica, hipertensão arterial (HAS), diminuição do HDL-c e hipertrigliceridemia (NCEP-ATP III, 207; IDF, 2018). No estudo de Marchi e colaboradores (2017), a prevalência dos componentes da síndrome metabólica foi maior nas mulheres pós-menopausa com DM2, com associação estatisticamente significativa para baixos níveis de HDL-c, hipertensão e hiperglicemia. Esses componentes também foram descritos como prevalentes em mulheres na pós-menopausa no Irã, Coréia do Sul e Polônia, bem como no Brasil (MENDES, 2012). Vale frisar, entretanto, que as mulheres DM2 e menopausadas, acima de 65 anos, sem síndrome metabólica, apresentam índices maiores de risco para DAC do que homens DM2, sem síndrome metabólica e na mesma faixa etária (SARRAFZADEGAN *et al.*, 2013).

Níveis mais elevados de colesterol total, LDL e Apo-B encontrados após a menopausa, em comparação com as pré-menopausadas, não são completamente explicados pelo envelhecimento (PHAN e TOTH, 2014). Mas, as partículas de LDL mais densas e ricas em Apo-B são mais frequentes em mulheres na pós-

menopausa, enquanto as LDL maiores e mais flutuantes estão diminuídas. Estima-se que 14 a 30% das mulheres na pós-menopausa tenham predominância de partículas pequenas e densas de LDL, em contraste com apenas 5-7% na pré-menopausa (CAMPOS *et al.*, 1992; FONSECA *et al.*, 2017).

Grandes partículas de HDL, também chamadas HDL2, desempenham um papel essencial no transporte reverso do colesterol e são considerados cardioprotetores (FORTI e DIAMENT, 2006; RIZZO *et al.*, 2006; HAFIANE *et al.*, 2015). Entretanto, nas mulheres na pós-menopausa, as HDL2 estão diminuídas, com predomínio de partículas menores de HDL com depleção de colesterol (WILLIAM e FELDMAN, 2011; MARTIN *et al.*, 2015), não sendo capazes de transportar adequadamente os ésteres de colesterol para o fígado, contribuindo para o aumento das concentrações de colesterol no sangue. Além disto, na pós-menopausa, a afinidade pelo receptor de LDL hepático é reduzida à LDL pequena e densa, que é mais suscetível à oxidação, transporte transendotelial e deposição na parede arterial. Essa subfração de LDL há muito é considerada pela comunidade científica como um fator de risco independente para DAC (FONSECA *et al.*, 2017). Yang e colaboradores (2005) demonstram que em decorrência de um transporte reverso do colesterol deficitário há uma maior correlação entre os níveis séricos de triglicérides e a distribuição do tamanho das partículas de HDL do que as concentrações de colesterol total, levando a um maior risco aterogênico. Assim, a proporção das subclasses da HDL relaciona-se às alterações das concentrações de triglicérides, colesterol total, HDL e LDL (USHIROYAMA *et al.*, 2005). Apesar disto, a modificação do metabolismo lipídico em mulheres na menopausa ainda não é um processo bem compreendido uma vez que isto envolve não apenas as alterações da HDL, mas inúmeros outros processos, uma vez que a produção, o remodelamento e a remoção das lipoproteínas é um processo dinâmico, mediado por muitos fatores, como enzimas, proteínas de transferência e apolipoproteínas (ZHANG *et al.*, 2001; PASCOT *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2005).

Segundo Gibriela (2007), que em seu estudo separou mulheres na pré e pós-menopausa, as concentrações séricas da LDL, VLDL, HDL, Apo A-I e Apo-B não sofreram alterações com significância estatística. Vale salientar, entretanto, que este estudo apresentou rigor nos critérios de inclusão a não permitir a inclusão de mulheres com níveis elevados de colesterol total e de triglicérides. Além disso, o aumento do risco de DAC em mulheres diabéticas na pós-menopausa está

relacionado a baixos níveis de HDL, hipertrigliceridemia e predominância de partículas pequenas e densas de LDL (RUSSO *et al.*, 2014). Saliente-se que a hipertrigliceridemia é constante em mulheres DM2 e isto faz com que ocorra a diminuição da concentração de HDL plasmático, principalmente a diminuição da HDL2 e aumento da HDL3. Adicionalmente, pacientes DM2 com outros distúrbios do espectro da síndrome metabólica, contribuem para uma mortalidade cardiovascular elevada (WILSON e D'AGOSTINO, 2006). Curiosamente, o impacto deletério da DM2 no tamanho de partícula de LDL parece ser maior nas mulheres diabéticas que nos homens (BERG e MUZZIO, 2004) e as mulheres diabéticas na pós-menopausa exibiram diminuição das partículas grandes de HDL (HDL2) junto com o aumento das partículas pequenas de HDL em comparação com mulheres normoglicêmicas após a menopausa (FONSECA *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se há diferença na transferência de lípidos e atividade da paraoxonase em função da menopausa e hipertrigliceridemia em mulheres diabéticas tipo 2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar e comparar a transferência de CL, CE, PL e TG para a HDL utilizando nanopartícula lipídica artificial (LDE) semelhante a LDL em grupo de mulheres diabéticas não menopausadas e menopausadas, normo (TG < 150mg/dL) e hipertrigliceridêmicas (150-300mg/dL), intra e intergrupos.
- Determinar e comparar a atividade da paraoxonase (PON-1) em grupo de mulheres diabéticas não menopausadas e menopausadas, normo (TG < 150mg/dL) e hipertrigliceridêmicas (150-300mg/dL), intra e intergrupos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

Estudo observacional, transversal, desenvolvido em cooperação com o Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor-HCFMUSP-SP (Instituto do Coração-Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-SP) e Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia (LACTFAR) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

A amostra populacional foi selecionada por conveniência na recepção do LACTFAR (pacientes SUS), composta inicialmente de 63 pacientes, sexo feminino, pareadas por faixa etária e comorbidades associadas, residentes e domiciliadas em Salvador, entre 25 e 70 anos, nas quais foram realizadas coletas de sangue periférico em cada uma delas. Antes de ingressarem no estudo, foi explicado pela pesquisadora responsável (doutoranda) às participantes, detalhadamente e de forma verbal, com linguagem simples e clara, o objetivo do projeto; e todas que aceitaram a participação assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) e preencheram o questionário epidemiológico (Anexo 3).

Os materiais utilizados, reativos e solventes, equipamentos e os conjuntos diagnósticos para a obtenção do perfil lipídico, biomarcadores de ação antioxidante, bem como demais biomarcadores da transferência de lipídios (CL, CE, PL e TG) da nanoemulsão para HDL foram adquiridos na indústria químico-farmacêutica nacional e a partir de importação direta.

Para a seleção dos indivíduos foram atribuídos os seguintes critérios:

4.1.1 Critérios e condições de exigibilidade

4.1.1.1 Critérios de inclusão

- sexo feminino;
- idade entre 25 e 70 anos (as pacientes que foram consideradas menopausadas foram aquelas que não menstruavam há mais de 02 anos de forma natural);
- pacientes ambulatoriais;

- pacientes diabéticas tipo 2 há pelo menos 05 anos, com HbA1c maior ou igual a 7% (ADA, 2018);
- ter realizado a determinação do perfil lipídico;
- pacientes em uso ou não de medicamentos (à exceção de estatinas);
- termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado.

4.1.1.2 Critérios de não inclusão

- pacientes hospitalizados por qualquer motivo;
- presença de patologias de temporalidade aguda;
- indivíduos portadores de disfunção renal (creatinina sérica > 2,0mg/dL) e ou síndrome nefrótica (proteinúria > 3,0g/L e albumina sérica < 3,0g/L);
- evidência clínica ou laboratorial de qualquer doença crônica como tireoidopatias, hepatopatias, nefropatias, doenças autoimunes e doenças do tecido conjuntivo e neoplasias;
- pacientes histerectomizadas;
- pacientes em reposição hormonal;
- pacientes em uso de anticoncepcivo;
- pacientes em uso de DIU hormonal;
- pacientes em uso de estatinas e insulina;
- não consentimento em participar da pesquisa.

4.1.1.3 Critérios de Exclusão

- pacientes que por qualquer motivo descontinuaram a participação no estudo ou solicitaram desligar-se do projeto.

4.2 DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS

Para confirmação do diabetes os pacientes tiveram coleta de sangue para avaliar a presença de hiperglicemia e produtos de glicação (ADA, 2018). As determinações laboratoriais foram realizadas em amostras de soro e plasma obtidas após 12 horas de jejum. As concentrações de colesterol total (CT), suas

frações e triglicérides (TG) foram determinadas por método enzimático. O HDL colesterol (HDL) (colesterol livre e esterificado) foi determinado por método homogêneo (Labtest®) e quando necessário após a precipitação das VLDL e LDL pelo método de Burnstein (1970). As concentrações do colesterol de VLDL e LDL foram calculadas pela fórmula de Friedewald (1972), para valores de TG até 150mg/dL. Amostras com TG superior a 150mg/dL foram feitas as determinações de LDL realizadas por método homogêneo (CORDOVA & CORDOVA, 2013). Foi utilizado o equipamento automatizado LabMax 560 Labtest *Clinical Chemistry Analyzer* (Brasil®), e HbA1c por HPLC/CLAE em método rastreável pelo NSGP. Os resultados foram validados com a utilização, durante cada rodada de determinações, com controle fornecido pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade – PNCQ, da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas e CONTROLAB, ensaio de proficiência da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial – SBPC/ML.

As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas, após jejum de 12 horas, em EDTA (1,5g/L) e o plasma foi obtido após 10 minutos de centrifugação, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. Foram incubadas 50 µL da LDE marcada radioativamente com ^3H -colesterol éster ($^3\text{H-CE}$) e ^{14}C -fosfatidilcolina ($^{14}\text{C-PL}$), ou ^3H -triglicérides ($^3\text{H-TG}$) e ^{14}C -colesterol livre ($^{14}\text{C-CL}$) com 200 µL de plasma por 60 minutos, a 37°C, em agitador orbital Infors HT Ecotron, sob agitação de 400 rpm. Após incubação foram adicionados à mistura 250µL de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo Apo B (sulfato de dextran 0,2%/ MgCl_2 3M, v/v). A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000rpm. A fração HDL foi obtida após precipitação da nanoemulsão (LDE) e das lipoproteínas contendo apoB, com 250µL dextran/ MgCl_2 (0,2% Dextran e 0,3mol/L MgCl_2). A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000rpm. Alíquotas de 250µL do sobrenadante, contendo a HDL, foram pipetadas em frascos de cintilação. Foram acrescentados a esses frascos, 5,0mL de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA) e, finalmente, a radioatividade presente nas amostras foi quantificada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA) com a utilização do software Plus Vers. 5.01 da Diamond

Computers, para determinação das contagens de ^{14}C e ^3H das amostras. O branco para este experimento consistiu da mistura de 200 μL de solução tampão TRIS-HCl e 50 μL de LDE, incubada e precipitada nas mesmas condições descritas acima. O valor de radioatividade total presente na amostra foi determinado pela incubação de 200 μL de plasma com 50 μL de LDE, seguida de incubação, porém sem adição de reagente de precipitação. A quantificação dos lipídios transferidos da LDE para HDL plasmática foi expressa como percentagem (%) em relação à radioatividade total incubada (MARANHÃO *et al.*, 1993).

Para determinação da atividade da PON-1 foi utilizado método descrito por Mackness e colaboradores (1991), Graham e colaboradores (1997) e Senti e colaboradores (2003), que utiliza a reação de hidrólise do Paraoxon com formação de p-nitrofenol e dietilfosfato, com algumas adaptações (CHARLTON-MENYS & DURRINGTON, 2006), sendo determinada a partir da taxa de produção de p-nitrofenol em nMol por mL de plasma por minuto. Em placa acrílica de fundo chato com 96 poços foram distribuídas, em cada poço, 7 μL de soro de cada amostra e acrescentados 140 μL de tampão com 0,1 mMolar de Tris-HCl, 2mMolar de CaCl_2 e 1,1mMolar de paraoxon (dietil 4-nitrofenil fosfato; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Os ensaios foram realizados em duplicata. A leitura foi feita em comprimento de onda de 405nm à temperatura de 37°C utilizando “Leitor de Microplacas” (Microplate Reader, Benchmark, BioRad). Foram realizadas 6 leituras em intervalos de 60 segundos cada. Para o cálculo da atividade da PON-1, a média da variação das absorbâncias foi multiplicada por fator de correção, conforme abaixo:

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

VTR: Volume total da reação

VA: Volume da amostra

E: Espessura da parede da placa ($\epsilon_{405}^{-1805} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Então a atividade da PON-1 = Fator x $\Delta\text{abs}/\text{min}$.

4.3 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 D'Agostino. Para início das análises estatísticas inferenciais, foi realizado o teste de *Grubb* para detecção de *outliers*; quando o teste foi significativo, o valor encontrado foi suprimido para a realização das análises. Para a estatística inferencial, foi realizada análise paramétrica em função do tipo de distribuição dos dados de cada variável (teste t não pareado, e teste F para comparação das variâncias). A significância, ou seja, a diferença entre os grupos foi aceita quando o nível crítico (p) foi inferior a 0,05 (5%) para o intervalo de confiança (I.C.) de 95%. Os dados estão apresentados por média e desvio padrão e número (n) de dados por tipo variável em cada grupo. Foi realizada também a análise de correlação linear de Pearson entre os percentuais de transferência da nanoemulsão artificial para a HDL, e com marcadores do perfil lipídico. Para a análise dos dados foram utilizados os Softwares *GraphPad InStat v.3.05* e *GraphPad Prism 5.01* (*GraphPad Software, Inc., CA, USA*).

5 RESULTADOS

A Tabela 4 (A, B, C e D) apresenta os dados das pacientes do estudo segregados por concentração sérica de triglicérides (TG) e condição clínica, ou seja, não menopausadas (NM) e menopausadas (M), respeitando os critérios de inclusão previamente estabelecidos. A Tabela 5 abaixo mostra os valores médios e desvio padrão dos dados laboratoriais obtidos. Na mesma tabela, são apresentados os resultados das análises de comparação entre as estimativas de cada variável entre os grupos, em função da concentração de triglicérides (TG), ou seja, segregados por grupo de TG e condição de não menopausa e menopausa: TG < 150mg/dL em não menopausadas (NM), TG < 150mg/dL em menopausadas (M), TG 150-300mg/dL em NM e TG 150-300mg/dL em M. A Tabela 6 apresenta os resultados da atividade da paraoxonase (PON-1) para as pacientes subdivididas nos grupos já descritos em normotrigliceridêmicas NM e M (TG < 150mg/dL) e hipertrigliceridêmicas (TG 150-300mg/dL) NM e M, com realização de análise paramétrica.

Tabela 4(A). Características gerais dos pacientes do sexo feminino não menopausadas (NM) com triglicérides < 150mg/dL.

Pacientes	Idade	Co-Morbidade	Medicação
RSP	50	Hipertensão	Glifage, Diamicron, Losartana
GFS	37	Não	Não
JJL	40	Não	Calcitran
MCMS	47	Não	Metformina
BSCC	42	Não	Metformina
GCS	39	Hipertensão	Metformina, Losartana
ASS	51	Hipertensão	Losartana, Metformina
SS	42	Não	Metformina
ASG	37	Não	Metformina
GCA	24	Não	Não
ASC	46	Não	Não
MAC	27	Não	Não
DSR	38	Não	Não
BA	29	Não	Não

OS = Ordem de Serviço; idade em anos.

Tabela 4(B). Características gerais dos pacientes do sexo feminino menopausadas (M) com triglicérides < 150mg/dL.

Pacientes	Idade	Co-Morbidade	Medicação
MASF	62	Hipertensão	Metformina, Losartana
FBA	52	Não	Diamicron, Glicobay, Metformina
RSP	52	Hipertensão	Glifage, Diamicron, Losartana
MGSS	57	Hipertensão	Metformina, Losartana
MGS	54	Não	Metformina, Clorana
MVS	62	Não	Não
MMJ	66	Hipertensão	Metformina, Losartana, Hidroclorotiazida
MRSH	56	Hipertensão	Metformina, Losartana
MCS	57	Hipertensão	Metformina, Losartana
MRJS	56	Não	Metformina
MRSJ	58	Hipertensão, Labirintite	Metformina, Losartana, Diamicron
IMS	56	Não	Não
IMCM	59	Não	Não
NFS	60	Hipertensão	Losartana, Metformina
MJS	56	Hipertensão	Metformina, Hidroclorotiazida

OS = Ordem de Serviço; idade em anos.

Tabela 4(C). Características gerais dos pacientes do sexo feminino não menopausadas (NM) com triglicérides entre 150 e 300mg/dL.

Pacientes	Idade	Co-Morbidade	Medicação
SMJS	48	Não	Metformina
JBL	44	Não	Metformina
GGSO	55	Não	Não
MAS	57	Não	Não
CEB	42	Não	Não
LSJ	46	Não	Não
FPS	42	Não	Não
MRB	52	Hipertensão	Losartana
MGS	58	Não	Não
JCR	59	Não	Glicobay
AOS	34	Não	Não
JMBA	31	Não	Não

OS = Ordem de Serviço; idade em anos.

Tabela 4(D). Características gerais dos pacientes do sexo feminino menopausadas (M) com triglicérides entre 150 e 300mg/dL.

Pacientes	Idade	Co-Morbidade	Medicação
MSAS	56	Hipertensão	Captopril, Daonil
MVMJ	63	Não	Não
NMPS	56	Hipertensão	Losartana
LFS	63	Hipertensão	Metformina, Losartana
DJB	63	Não	Não
RNS	65	Não	Não
RSG	52	Hipertensão	Metformina, Glimepinide, Cálcio, Ômega 3, Captopril
SC	59	Não	Não
IGA	52	Hipertensão	Enalapril, Hidroclorotiazida, Metformina
MCSB	62	Não	Não
MASP	58	Não	Não
ASP	63	Não	Não
GSS	65	Não	Não
MTS	56	Hipertensão	Metformina, Hidroclorotiazida
RAC	63	Não	Glibenclamide, Losartana
SSR	63	Hipertensão	Metformina, Losartana
MDLS	56	Não	Não
CMS	55	Não	Metformina, Glindamicida
MBS	66	Hipertensão	Glinfage, Losartana, Hidroclorotiazida, Omeprazol
LMG	64	Hipertensão	Losartana, Metformina
ACB	67	Não	Não
MSS	51	Não	Metformina

OS = Ordem de Serviço; idade em anos.

Tabela 5. Dados dos marcadores bioquímicos e estimativas utilizadas para avaliação das pacientes, estratificadas por grupos entre normotrigliceridêmicas (TG <150mg/dL) e hipertrigliceridêmicas (TG 150-300mg/dL), não menopausadas (NM) e menopausadas (M) participantes do estudo.

MARCADORES E ESTIMATIVAS	DM-TG < 150 NM (n=14)	DM-TG < 150 M (n=15)	DM-TG 150-300 NM (n=12)	DM-TG 150-300 M (n=22)	ANÁLISE INFERENCIAL INTRA E INTER-GRUPOS	
Glicemia (mg/dL)	201,71 ± 73,40	210 ± 70,46	212,33 ± 58,21	202,5 ± 54,50	TG < 150 NM vs 150 M	n.s.
					TG 150-300 NM vs 150-300 M	n.s.
HbA1c (%)	9,91±2,65	10,49 ± 2,39	10,06 ± 1,79	10,52 ± 1,69	TG < 150 NM vs 150 M	n.s.
					TG 150-300 NM vs 150-300 M	n.s.
HDL-c (mg/dL)	67,71 ± 12,16	71,8 ± 13,90	53,5 ± 10,89	60,63 ± 16,48	TG < 150 NM vs 150 M	n.s.
					TG 150-300 NM vs 150-300 M	p = 0,07
Não-HDL-c (mg/dL)	134,28 ± 48,49	121,20 ± 42,37	154,25 ± 34,01	165,63 ± 44,46	TG < 150 NM vs 150 M	n.s.
					TG 150-300 NM vs 150-300 M	n.s.
CT(mg/dL)	202,71 ± 48,46	193 ± 44,12	207,75 ± 39,67	221,63 ± 44,11	TG < 150 NM vs 150 M	n.s.
					TG 150-300 NM vs 150-300 M	n.s.
LDL-c (mg/dL)	113,28 ± 47,45	97,06 ± 42,88	114,75 ± 33,66	120,78 ± 36,42	TG < 150 NM vs 150 M	n.s.
					TG 150-300 NM vs 150-300 M	n.s.
TG (mg/dL)	104,92 ± 24,84	111,46 ± 21,41	208,83 ± 47,44	213,13 ± 49,32	TG < 150 NM vs 150 M	n.s.
					TG 150-300 NM vs 150-300 M	n.s.
TG/HDL-c	1,64±0,59	1,61±0,42	4,01±1,23	3,76±1,32	TG < 150 NM vs 150 M	n.s.
					TG 150-300 NM vs 150-300 M	n.s.

Foi realizada análises paramétrica em função do tipo de distribuição dos dados de cada variável (teste t não pareado, e teste F para comparação das variâncias). A significância, ou seja, a diferença entre os grupos foi aceita quando o nível crítico (p) foi inferior a 0,05 (5%) para o intervalo de confiança (I.C.) de 95%. Foi realizado teste para detecção de *outliers* (teste de *Grubb*), quando o teste foi significativo, o valor encontrado foi suprimido para a realização das análises. Os dados são apresentados por média ± desvio padrão e número (n) de dados por tipo variável em cada grupo.

Tabela 6. Dados da atividade da paraoxonase (PON-1) utilizadas para avaliação das pacientes, estratificadas por grupos entre normotrigliceridêmicas (TG <150mg/dL) e hipertrigliceridêmicas (TG 150-300mg/dL), não menopausadas (NM) e menopausadas (M) participantes do estudo.

MARCADOR	DM-TG < 150 NM	DM-TG < 150 M	DM-TG 150-300 NM	DM-TG 150-300 M	ANÁLISE INFERENCIAL INTRA E INTER-GRUPOS	
PON-1	36,80 ± 8,39 (n=10)	49,00 ± 5,22(n=16)	59,00 ± 7,46 (n=10)	33,57 ± 4,61 (n=14)	TG < 150NM vs 150-300NM	0,0318
					TG < 150M vs 150-300M	0,0186
					TG < 150NM vs 150M	0,1018
					TG 150-300NM vs 150-300M	0,0029

Foi realizada análise paramétrica em função do tipo de distribuição dos dados (teste t não pareado e teste F para comparação das variâncias). A significância, ou seja, a diferença entre os grupos foi aceita quando o nível crítico (p) foi inferior a 0,05 (5%) para o intervalo de confiança (I.C.) de 95%. Foi realizado teste para detecção de *outliers* (teste de *Grubb*). Quando o teste foi significativo, o valor foi suprimido para a realização das análises. Os dados são apresentados por média ± erro padrão da média e número (n) de dados por tipo variável em cada grupo. Sigla não convencional utilizada: PON-1 = atividade da Paraoxonase (nmol p-nitrofenol.min⁻¹.mL⁻¹).

Tabela 7. Dados da transferência de PL (^{14}C -PL) para a HDL, utilizando modelo de lipoproteínas artificiais para avaliação das pacientes, estratificadas por grupos entre normotriglicéridêmicas (TG <150mg/dL) e hipertriglicéridêmicas (TG 150-300mg/dL), não menopausadas (NM) e menopausadas (M) participantes do estudo.

MARCADOR	DM FEMININO TG < 150 NM	DM FEMININO TG < 150 M	DM FEMININO TG 150-300 NM	DM FEMININO TG 150-300 M	ANÁLISE INFERENCIAL INTRA E INTER-GRUPOS		
^{14}C -PL	12,84% (n=14)	16,09% (n=15)	16,60% (n=11)	16,37% (n=20)	TG < 150 NM vs 150-300 NM	< 0,0001	
					TG < 150 M vs 150-300 M	0,2283	
						TG < 150 NM vs 150 M	< 0,0001
						TG 150-300 NM vs 150-300 M	ns

Foi realizada análise paramétrica em função do tipo de distribuição dos dados (teste t não pareado e teste F para comparação das variâncias). A significância, ou seja, a diferença entre os grupos foi aceita quando o nível crítico (p) foi inferior a 0,05 (5%) para o intervalo de confiança (I.C.) de 95%. Foi realizado teste para detecção de *outliers* (teste de *Grubb*). Quando o teste foi significativo, o valor foi suprimido para a realização das análises. Os dados são apresentados por média \pm erro padrão da média e número (n) de dados por tipo variável em cada grupo. Sigla não convencional utilizada: transferência de PL (^{14}C -PL) para a HDL = ^{14}C -PL%.

Em relação aos outros radiotraçadores utilizados (^{14}C CL; ^3H CE; ^3H TG) para avaliar a transferência de colesterol livre (CL), colesterol esterificado (CE) e triglicérides (TG) não se observou diferença significativa entre os grupos de pacientes estratificados segundo perfil lipídico em: normotrigliceridêmicos (TG <150) e hipertrigliceridêmicos (TG 150-300), não menopausadas (NM) e menopausadas (M) após análise comparativa. A análise de correlação linear de Pearson entre o percentual de ^3H CE e ^{14}C PL transferidos de uma nanoemulsão artificial para a HDL mostrou significância (Figura 5), além disso, verificou-se também correlação linear de Pearson entre o percentual de ^3H CE transferidos da nanoemulsão artificial para a HDL com TG (mg/dL) no grupo DM2 TG 150-300 NM (Figura 6).

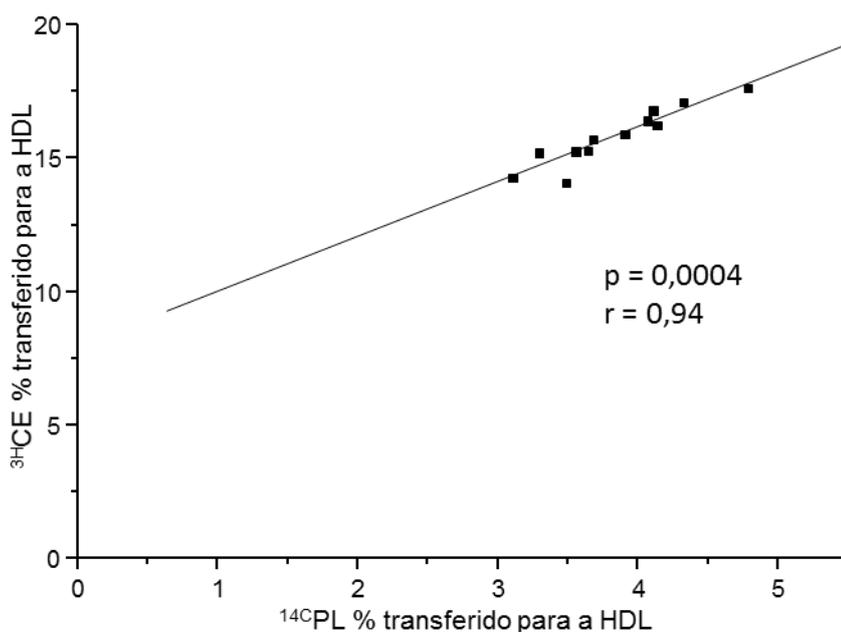


Figura 5. Análise de correlação linear de Pearson entre o percentual de ^3H CE e ^{14}C PL transferidos de uma nanoemulsão artificial para a HDL no grupo DM2 TG 150-300mg/dLM.

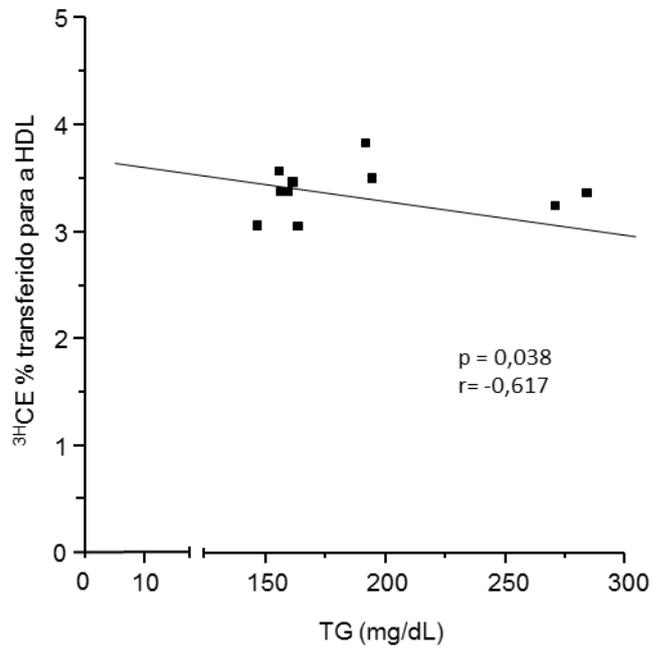


Figura 6. Análise de correlação linear de Pearson entre o percentual de ³HCE transferidos de uma nanoemulsão artificial para a HDL com TG no grupo DM2 TG 150-300mg/dL NM.

6 DISCUSSÃO

Durante muitos anos, foi controverso que o maior risco para o desenvolvimento da DAC em mulheres poderia ser resultante do processo de envelhecimento ou consequência da menopausa, ou ambos (GIBRIELA, 2007). Entretanto, de acordo com Fonseca e colaboradores (2017), a menopausa e o DM2 aumentam substancialmente o risco cardiovascular no sexo feminino, em virtude das modificações no metabolismo lipídico e de lipoproteínas circulantes. Observa-se então que as subfrações lipoproteicas são alteradas após a menopausa, gerando assim um perfil lipoproteico mais aterogênico, associado à presença de hipertrigliceridemia, baixa concentração de colesterol HDL (HDL-c), principalmente redução da subfração lipoproteica de HDL2, além do aumento da quantidade de partículas da subfração HDL3 e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), como as LDL pequenas e densas.

Após a menopausa, o colesterol total (CT) e o colesterol LDL, geralmente aumentam, e essas alterações são acompanhadas por diminuição no colesterol da HDL e aumento dos triglicérides (TG) (SCHAEFER *et al.*, 1994; KORZEN-BOHR *et al.*, 2006). Além dessas importantes alterações do perfil lipídico, também se espera que modificações no tamanho e na densidade dessas partículas lipoproteicas ocorram após a perda da função ovariana na produção hormonal de estrogênios (LIZ *et al.*, 1996; STEVENSON *et al.*, 2009; VITORINO *et al.*, 2013). Isso explica parcialmente o aumento do risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa, particularmente entre aquelas com menopausa precoce (ANAGNOSTIS *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, em que vários biomarcadores séricos e plasmáticos foram determinados, observamos influência significativa da hipertrigliceridemia na atividade intragrupo da enzima paraoxonase (PON-1), independente da presença ou não da menopausa. Por outro lado, na análise intergrupo (NM vs M), apenas para a concentração de triglicérides entre 150-300mg/dL, a atividade da paraoxonase foi significativamente mais alta no grupo de mulheres DM2 não menopausadas. Diferentemente de Butorac e colaboradores (2014) que em estudo com casuística semelhante, não encontraram diferença significativa na atividade da PON-1. Cumpre ressaltar, entretanto, que embora

não tenham encontrado diferença significativa, a condição por eles testada deu-se na ausência de hipertrigliceridemia. Por outro lado, Kostapanos e Elisaf (2014) também observaram redução da atividade da paraoxonase na presença de hipertrigliceridemia, o que corrobora nossos resultados. Eles justificaram a baixa atividade da PON-1 em função da presença de alta proporção de partículas de HDL disfuncional nessa condição. Além disso, Taskinén e Borin (2015), bem como Bernes e Rizo (2004), observaram que tanto em homens quanto em mulheres com DM2 há a presença de dislipidemia diabética, já bem descrita, caracterizada por presença de hipertrigliceridemia, HDL-c baixo e aumento da proporção de partículas de LDL pequenas e densas, ou seja, partículas mais propensas à oxidação e/ou outras modificações estruturais, achados também encontrados por Nobécourt e colaboradores (2005) e Rydén e colaboradores (2013).

A hiperglicemia também está associada com a presença de lipoproteínas disfuncionais, em função de glicação proteica e desestabilização de partícula, condição que, independente do sexo, contribui com a formação de perfil lipídico aterogênico (GOMEZ *et al.*, 2017). Apesar de compartilhar essas anormalidades lipídicas em ambos os sexos, a mulher diabética tem mostrado a forma mais precoce de DAC, e é mais suscetível à morte por eventos coronarianos (HUXLEY *et al.*, 2006; BALLOTARI *et al.*, 2015). Fatos estes que sugerem a presença de perfil lipoproteico aterogênico, disfuncional e deletério, principalmente na menopausa.

Em relação à transferência de lípidos para a HDL, usando o modelo de lipoproteína artificial, nanopartícula lipídica (LDE), entre todas as outras moléculas marcadas com radiotraçadores (^{14}C CL; ^3H CE; ^3H TG) usadas no nosso experimento, apenas a transferência de fosfolípidos (^{14}C PL) foi significativa. Observamos que na análise intragrupo (grupo NM) a transferência de PL foi significativamente maior no grupo com maior concentração de triglicérides (150-300mg/dL). Ainda na análise intragrupo, nas mesmas condições testadas, não houve diferença significativa para o grupo M, quando comparado às transferências de PL entre amostras com TG < 150mg/dL e entre 150-300mg/dL. Por outro lado, quando realizada a análise intergrupos (NM vs M) para TG < 150mg/dL, a transferência de PL foi significativamente maior no grupo M – pacientes menopausadas. Embora a análise da

transferência de PL intergrupos (NM vs M) com TG < 150mg/dL tenha sido significativa, para a faixa de TG entre 150mg/dL a 300mg/dL, não houve significância.

No estudo de Feitosa e colaboradores (2009), comparando a transferência de fosfolípides entre população de diabéticos com TG entre 78 a 220mg/dL, média em 149mg/dL, e o grupo controle com TG entre 56 a 128mg/dL, média em 92mg/dL, obteve-se diferença significativa. A diferença entre os percentuais de transferência de PL no estudo de Feitosa foi de 5,5% em média, sendo 25,2% para os pacientes diabéticos e 19,7% para os controles. No nosso estudo, embora a comparação tenha sido entre pacientes DM2 menopausadas e não menopausadas, obtivemos a diferença percentual significativa de 3,25% para a mesma concentração de TG, ou seja, TG < 150mg/dL; e 3,76% quando comparados os grupos entre as pacientes não menopausadas (grupo NM, TG < 150mg/dL vs 150 a 300mg/dL), ou seja, valores percentuais próximos aos encontrados por Feitosa e colaboradores, embora inferiores, provavelmente em função da presença de hipertrigliceridemia em nossa casuística. Como sabemos a transferência de fosfolípides (PL) e de certa quantidade de colesterol livre (CL), é mediada pela ação da proteína de transferência de fosfolípides (PLTP) (JIANG X-C, 2018) Estudo recente sobre associação genômica (do inglês, GWA) identificou um único polimorfismo de nucleotídeo (do inglês, SNP) próximo ao gene da PLTP que está associado com a concentração de HDL-c e de triglicérides (TG).

Curiosamente, a variante associada com maior concentração de HDL-c e menor de TG também foi correlacionada com maiores níveis de transcrição de PLTP no fígado (modelo murínico expressando gene humano). Esta é a primeira evidência de uma ligação direta entre níveis de PLTP e lipoproteínas em humanos. Os efeitos sobre os níveis de HDL são consistentes com os estudos utilizando camundongos transgênicos, mas a aparente redução de triglicérides em associação com o aumento da expressão de PLTP ainda não foi confirmada (YAZDANYAR A *et al.*, 2011). Achados esses que corroboram nossos resultados, visto que o aumento da transferência de PL foi significativamente maior nos pacientes do grupo NM com TG entre 150mg/dL e 300mg/dL, e no grupo com TG < 150mg/dL menopausadas. Embora não tenhamos encontrado relatos na literatura científica, nos parecer que a

elevação da atividade de transferência nesse grupo (grupo M, TG < 150mg/dL), esteja relacionada à perda da proteção hormonal (estrogênica) observada na menopausa, pois, a atividade da PLTP está diretamente relacionada à produção de partículas ricas em TG, como as VLDL (JIANG X-C, 2018).

Ainda em nosso estudo, a análise de correlação linear entre o percentual de ^3H CE e ^{14}C PL transferidos da nanoemulsão para a HDL foi positiva e significativa. Conforme o estudo de Jiang (2018), em pacientes diabéticos com hipertrigliceridemia o aumento da atividade da PLTP (aumento da transferência de PL) está relacionada com o aumento do efluxo de colesterol, fato esse que corrobora nossos achados. Por outro lado, a análise de correlação linear, entre o percentual de ^3H CE transferidos da nanoemulsão para a HDL com TG, no grupo DM2 TG 150-300 NM, obtivemos correlação negativa e significativa. Segundo Harch e colaboradores (2007), a atividade da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) está aumentada em pacientes hipertrigliceridêmicos, mas não necessariamente associados a aumento na massa de CETP. Como consequência, a alta concentração de lipoproteínas ricas em TG, o excedente de CETP começará a usar a LDL, além da HDL como doador CE. De fato, a atividade de CETP demonstrou-se preditiva de DAC, predominantemente em pacientes com alta concentração de triglicérides.

7 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, observamos influência significativa da hipertrigliceridemia na atividade intragrupo da enzima paraoxonase (PON-1), e na análise intergrupo (NM vs M); e apenas com TG entre 150-300mg/dL, a atividade da paraoxonase foi significativamente mais alta no grupo de mulheres DM2 não menopausadas. Em relação à transferência de lípidos, utilizando o modelo de lipoproteína artificial, nanopartícula lipídica (LDE), apenas a transferência de fosfolípidos (^{14}CPL) foi significativa, sendo que a transferência foi significativamente maior no grupo com maior concentração de triglicérides (150-300mg/dL); e na análise intergrupos (NM vs M) para TG < 150mg/dL, a transferência de fosfolípidos foi significativamente maior no grupo M.

No nosso estudo, obtivemos a diferença percentual significativa de 3,25% para a concentração de TG < 150mg/dL; e 3,76% quando comparados os grupos entre as pacientes não menopausadas (grupo NM, TG < 150mg/dL vs 150-300mg/dL).

A análise de correlação linear entre o percentual de ^3HCE e ^{14}CPL transferidos da nanoemulsão para a HDL foi positiva e significativa, sendo que a análise de correlação linear entre o percentual de ^3HCE transferidos da nanoemulsão para a HDL com TG, no grupo DM2 TG 150-300 NM, observou-se uma correlação negativa e significativa.

Desta forma, os achados desse estudo mostram que não apenas a hipertrigliceridemia diabética, mas que em determinadas condições a menopausa também influencia o metabolismo da HDL, a ação da paraoxonase e a transferências de fosfolípidos (PL) e para a HDL.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. K. *et al.* Achievement of goals in U.S. diabetes care.1999-2010. **New England Journal of Medicine**, v. 368, p. 1613-1624, 2013.
- AMARAL, L. F. T. **Remodelamento de partículas lipoproteicas de alta densidade (HDL) e atividade antioxidante entre pacientes diabéticos e não diabéticos com doença aterosclerótica coronária.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Standards of medical care in diabetes.** v. 41, jan. 2018. Supl.
- ANAGNOSTIS, P. *et al.* Effects of menopause, gender and age on lipids and high-density lipoprotein cholesterol subfractions. **Maturitas**, v. 81, p. 62-68, 2015.
- ASLAM, M. *et al.* Postprandial hypertriglyceridemia predicts development of insulin resistance glucose intolerance and type 2 diabetes. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. e0145730, 2016. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0145730>.
- ASSMANN, G.; NOFER, J. R. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. **Annual Review Medicine**, v. 54, p. 321-341,2003.
- BALLOTARI, P. *et al.* Sex differences in cardiovascular mortality in diabetic and non diabetic subjects: a population-based study (Italy). **International Journal of Endocrinology**, v. 91, p. 4057, 2015.
- BANSAL, S. *et al.* A study on serum advanced glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2 diabetic patients with vascular complications. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 109-114, 2013.
- BARTER, P. J.; RYE, K. A. Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 1755-1766, 2012.
- BERG, G.*et al.* A new approach to the quantitative measurement of dense LDL subfractions. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease**, v. 14, n. 73-80, 2004.
- BERG, G. A. *et al.* Higher values of hepatic lipase activity in postmenopause: relationship with atherogenic intermediate density and low density lipoproteins. **Menopause**, v. 8, p. 51-57,2001.
- BERNEIS, K.; RIZZO, M. LDL size: does it matter? **Swiss Medical Weekly**, v. 134, p. 720-724, 2004.

BOARDMAN, H. M. A. *et al.* Hormone therapy for preventing cardiovascular disease in post-menopausal women. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, CD002229, 2015. Disponível em: <doi:10.1002/14651858>.

BORGGREVE, S. E.; DE VRIES, R.; DULLAART, R. P. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin: cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, n. 12, p. 1051-1069, 2003.

BOUILLET, B. *et al.* Glycation of apolipoprotein C1 impairs its CETP inhibitory property: pathophysiological relevance in patients with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 37, p. 1148-1156, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/04/diabetes>>. Acesso em: 05 mar. 2018.

BRITES, F. D.; BONAVIDA, C. D.; DE GEITERE, C. *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, p. 181-192, 2000.

BRUNZELL, J. D.; FAILOR, R.A. Diagnosis and treatment of dyslipidemia. **ACP Medicine**, v. 1, p.1-23, 2010.

BUTORA, C. D. *et al.* Paraoxonase 1 activity and phenotype distribution in premenopausal and postmenopausal women. **Biochemical Medicine**, v. 24, p. 273-280, 2014.

BURNSTEIN, M.; SCHOLNICK, H. R.; MORFIN, R. A new accurate, simple formula for LDL-cholesterol estimation based on directly measured blood lipids from a large cohort. **Journal of Lipide Research**, v. 1, p. 583, 1970.

BUSE, J. B. *et al.* American Heart Association; American Diabetes Association. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 30, p. 162-172, 2007.

BUSHNELL, C. *et al.* Guidelines for the prevention of stroke in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 45, p. 1545-1588, 2014.

CAMPOS H. *et al.* LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring study. **Arteriosclerosis, Thrombosis Vascular Biology**, v. 12, p. 1410-1419, 1992.

CASSAR, A. *et al.* Chronic coronary artery disease: diagnosis and management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 84, p. 1130-46, 2009.

- CATAPANO, A. L. *et al.* ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias. The task force for the management of dyslipidemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). **Atherosclerosis**, v. 217, p. 3-46, 2011.
- CAVALLERO, E. *et al.* Abnormal reverse cholesterol transport in controlled type II diabetic patients. Studies on fasting and postprandial LpA-I particles. **Arteriosclerosis, Thrombosis Vascular Biology**, v. 15, p.2130-2135, 1995.
- CDC. **National Diabetes Statistics Report, 2017**. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. Division of Diabetes. USA, 2017.
- CHAHIL, T. J., GINSBERG H. N. Diabetic dyslipidemia. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 35, p. 491-510, 2006.
- CHANDRASEKHAR, V. Diabetes and Menopause. **Journal of Anesthesia & Critical Care: Open Access**, v. 6, p. 4, 2016.
- CHARLTON-MENYS, V.; DURRINGTON, P. Apolipoproteins AI and B as therapeutic targets. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, p. 462-72, 2006.
- COSTA, L. G. *et al.* Modulation of paraoxonase (pon1) activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 541-550, 2005.
- DE CORDOVA, C. M.; DE CORDOVA, M. M. A new accurate, simple formula for LDL-cholesterol estimation based on directly measured blood lipids from a large cohort. **Annales of Clinical Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 13-19, 2013. Disponível em: <doi:10.1258/acb.2012.011259>.
- DIDICHENKO, S. A. *et al.* Enhanced HDL Functionality in small HDL species produced upon remodeling of HDL by reconstituted HDL, CSL112: Effects on cholesterol efflux, anti-inflammatory and antioxidative activity. **Circulation Research**, v. 116, 2016. Disponível em:<doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308685>.
- DOUCET, J. *et al.* Glycaemic control and 5-year morbidity/mortality of type 2 diabetic patients aged 70 years and older: 1. Description of the population at inclusion. **Diabetes Metabolism**, v. 38, p. 523-530, 2012.
- FARBSTEIN, D.; LEVY, A. P. HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 10, n. 3, p. 353-361, 2012.
- FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES E GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA (FEBRASGO). **Climatério: manual de orientação**. FEBRASGO, 2010.
- FEITOSA FILHO, G. S. **Transferências de lípidos para HDL em pacientes diabéticos tipo 2: efeito da presença da microalbuminúria e do tratamento com estatina e insulina**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

- FEITOSA FILHO, G. S. *et al.* Lipid transfer to HDL in type-2 diabetic patients: associations with microalbuminuria, statin, and insulin. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, n. 2, 2009.
- FEITOSA, A. C. R. *et al.* Lipid transfer to HDL in women with type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, p. 1, 2009.
- FEMLAK, M. *et al.* The role and function of HDL in patients with diabetes mellitus and the related cardiovascular risk. **Lipids Health Disease**, v. 16, p. 207, 2017. Disponível em: <doi: 10.1186/s12944-017-0594-3>.
- FIGUEIREDO-NETO, A. A. *et al.* Síndrome metabólica e menopausa: estudo transversal em ambulatório de ginecologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, p. 1-23, 2010.
- FISHER, E. A. *et al.* High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 12, p. 2813-2820, 2012.
- FONSECA, M. I.; SILVA, I. T.; FERREIRA, S. R. Impact of menopause and diabetes on atherogenic lipid profile: is it worth to analyze lipoprotein subfractions to assess cardiovascular risk in women? **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 9, p. 22, 2017. Disponível em: < doi 10.1186/s13098-017-0221-5>.
- FORTI, N.; DIAMENT, J. Apolipoproteínas B A1: Fatores de risco cardiovascular? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 276-282, 2007.
- FORTI, N.; DIAMENT, J. High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. An update for clinicians. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 87, p. 672-679, 2006.
- FRIEDEWALD, W.; DONALD, S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 4, 1972.
- FRYIRS, M. A. *et al.* Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 8, p. 1642-1648, 2010.
- GAEDE, P. *et al.* Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 580-591, 2008.
- GASPARD, U. Hyperinsulinaemia, a key factor of the metabolic syndrome in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 62, p. 362-365, 2009.
- GASPARD, U. J. *et al.* Postmenopausal changes of lipid and glucose metabolism: a review of their main aspects. **Diabetes**, v. 51, p. 95, 1995.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar, como voluntária, do projeto de pesquisa acima descrito. A pesquisadora me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal da Bahia, localizado à Rua Barão do Jeremoabo, nº 147, Ondina - Salvador, Bahia - Brasil, CEP: 40.170-115. Telefones: 3283 - 6900.

Salvador, ____ de _____ de 20____.



Assinatura da participante

Impressão dactiloscópica

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento

Rubrica da pesquisadora: _____. Rubrica da participante: _____.

Página 3 de 3

Você faz uso de bebidas alcoólicas ? Sim Não

Se sim, quantas vezes na semana ou por dia? _____
