

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

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

**ATIVIDADE DA PARAOXONASE / ARIL-ESTERASE (PON) E INCORPORAÇÃO DE
FOSFOLIPÍDEOS EM PARTÍCULAS DE HDL NA HIPERTRIGLICERIDEMIA HUMANA**

MARCOS SOARES VIEIRA

Orientador: Prof^a Ricardo David Couto

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

**Salvador – Brasil
2013**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Será encadernada logo após a aprovação da banca.

Todo o meu saber consiste em saber que nada sei.

Sócrates

In memoriam, a meus pais: Isac e Amélia,
e aos muito amados alicerces da minha vida: Rute, Júlia e Guilherme.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

A meus pais (*in memoriam*) pelo exemplo e por minha educação moral e intelectual.

Ao Professor Ricardo David Couto pela orientação, confiança, paciência e amizade.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz – Fiocruz pela oportunidade e qualidade do ensino a mim oferecidos.

À Marinha do Brasil, representada pelos diretores do Hospital Naval de Salvador, CMG (Md) Oscar Passos e CMG (MD) Fraga, pelo apoio ao meu crescimento intelectual.

Aos grupos de pesquisa dos laboratórios LETI e LPBM – CpqGM / Fiocruz, pelo apoio técnico e cordialidade com que fui recebido.

Ao Prof. Dr. Ajax Mercês Atta, pelo auxílio nas determinações das apolipoproteínas.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Raul Maranhão do InCor-HCFM/USP, em especial à Dra. Débora Deus, pela ajuda nas determinações de tamanho de partículas.

Às FAPESB e CNPq pelo apoio na aquisição de insumos

Aos colegas do grupo de pesquisa em Dislipidemia da Faculdade de Farmácia da UFBA, especialmente Ana Paula, pelas opiniões e ajuda na realização dos ensaios.

Ao farmacêutico Lázaro e toda a equipe do laboratório de bioquímica da Faculdade de Farmácia, pelo coleguismo e apoio.

Aos Drs. Luiz Erlon Rodrigues e Daniel Athanazio pela atenção e contribuição dispensadas na finalização deste trabalho.

Aos pacientes que se colocaram à disposição para me auxiliar na busca do conhecimento, permitindo a utilização das amostras.

E principalmente à Rute, amor de minha vida, por sua constante compreensão e serenidade nos vários momentos de dificuldades que passei.

VIEIRA, Marcos Soares. Atividade da Paraoxonase / aril-esterase (PON) e incorporação de fosfolídeos em partículas de HDL na hipertrigliceridemia humana. 67 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

Doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morbidade e mortalidade do ocidente, aparecendo como causa mais frequente de óbitos nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Alterações no metabolismo das lipoproteínas estão diretamente relacionadas ao aumento do risco de DCV. **Objetivos:** Avaliar o remodelamento da partícula HDL determinando a capacidade de incorporação de fosfolídeos na HDL, a atividade da paraoxonase/aril-esterase (PON), dentre outros marcadores plasmáticos relacionados ao metabolismo da HDL, além da influência da hipertrigliceridemia neste processo. **Casuística e Métodos:** Estudo de corte transversal, com amostragem por conveniência. Foram avaliados ambulatorialmente 66 indivíduos do sexo masculino, idade entre 32 e 75 anos (média: 51,1), distribuídos em dois grupos, não-hipertrigliceridêmicos (NHipTRI) e hipertrigliceridêmicos (HipTRI), estes últimos estratificados em dois níveis, HipTRI HDL-C \geq 40 e HipTRI HDL-C $<$ 40. Foram realizados testes estatísticos paramétricos e não-paramétricos, utilizando o software GraphPad Prism 5.01 (USA), e as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ para intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** Não foram observadas diferenças nas prevalências dos fatores de risco para DCV, como sedentarismo, etilismo, hipertensão, diabetes e tabagismo, entre os grupos. A atividade da PON e a incorporação de fosfolídeos foram similares nos três grupos estudados. O tamanho estimado da partícula HDL foi maior no grupo NHipTRI ($0,29 \pm 0,05$), do que nos grupos hipertrigliceridêmicos: HipTRI HDL ≥ 40 ($0,26 \pm 0,03$), e HipTRI HDL < 40 ($0,24 \pm 0,05$). No grupo NHipTRI foi encontrada correlação linear positiva entre a atividade da PON e apoA ($r = 0,3908$, $p = 0,0484$, Pearson). Já no grupo HipTRI HDL ≥ 40 houve correlação positiva entre PON e apoB ($r = 0,5678$, $p = 0,0342$, Pearson). Por outro lado, no grupo HipTRI HDL < 40 houve correlação linear negativa entre apoB e incorporação de fosfolídeos na HDL ($r = -0,5144$, $p = 0,0290$, Pearson). **Conclusão:** Desta forma, os resultados sugerem que a hipertrigliceridemia interfere não só no remodelamento da HDL, como também sua capacidade antioxidante.

Palavras-chave: Lipoproteínas HDL, Doenças Cardiovasculares, Proteína de transferência de fosfolídeos, Paraoxonase.

VIEIRA, Marcos Soares. Paraoxonase / Arylesterase activity and phospholipids incorporation into HDL particles in human hypertriglyceridemia. .67 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading causes of morbidity and mortality in the western world and is the major cause of death in developed and developing countries. Lipoprotein metabolism is directly related to the risk of developing CVD. **Objectives:** this study aimed to evaluate HDL particle remodeling, determining HDL ability to incorporate phospholipids, paraoxonase (PON) activity, among others plasma markers related to HDL metabolism, besides the influence of hypertriglyceridemia in this process. **Casuistic and Methods:** a cross-sectional study with convenience sampling, were carried out with 66 subjects outpatient males, aged between 32 and 75 years old (mean: 51.1), into non-hypertriglyceridemic (NHipTRI) and hypertriglyceridemic (HipTRI) groups, the HipTRI group were stratified in HipTRI com HDL-C \geq 40 mg/dL and HipTRI com HDL-C $<$ 40 mg/dL. Parametric and non-parametric statistic tests were performed in GraphPad Prism 5.01 (USA), and differences were considered significant when $p < 0.05$ to C.I of 95%. **Results:** there were no differences in the prevalence of CVD risk factors, such as sedentarism, alcohol drinkers, hypertension, diabetes, and tobacco users in the groups. PON activity and phospholipids incorporation were similar in the three groups. The estimated size of HDL particles was greater in NHipTRI (0.29 ± 0.05) when compared to hypertriglyceridemic groups: HipTRI HDL \geq 40 mg/dL (0.26 ± 0.03) and HipTRI HDL $>$ 40 mg/dL (0.24 ± 0.05). In NHipTRI group positive linear correlation was found between PON activity and apoA ($r = 0.3908$, $p = 0.0484$, Pearson). In HipTRI HDL \geq 40 mg/dL group, positive correlation were found between PON and apoB ($r = 0.5678$, $p = 0.0342$, Pearson). On the other hand, HipTRI HDL $<$ 40 mg/dL shows a negative linear correlation between apoB and phospholipids incorporation into HDL ($r = -0.5144$, $p = 0.0290$, Pearson). **Conclusion:** the results suggest that hypertriglyceridemia can affect both remodeling of particles HDL, as their antioxidant capacity.

Key words: Cardiovascular diseases, HDL lipoprotein, phospholipid protein transfer, Paraoxonase.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA-1	- ATP <i>binding cassette transporter</i> A1
ALT	- alanina aminotransferase
apoA	- apolipoproteína A
apoB	- apolipoproteína B
AST	- aspartato aminotransferase
CETP	- proteína de transferência de éster de colesterol
CE	- colesterol esterificado
CL	- colesterol livre (não esterificado)
CT	- colesterol total
<i>d</i>	- densidade
DCV	- doença cardiovascular
g/mL	- gramas por mililitro
HDL	- lipoproteína de densidade alta
HDL-C	- colesterol da lipoproteína de densidade alta
HipTRI	- hipertrigliceridêmico
HipTRI HDL<40	- hipertrigliceridêmico com valor de HDL menor que 40mg/dL
HipTRI HDL ≥40	- hipertrigliceridêmico com valor de HDL maior ou igual a 40mg/dL
IDL	- lipoproteína de densidade intermediária
LCAT	- lecitina-colesterol-acil transferase
LDL	- lipoproteína de densidade baixa
LDL-C	- colesterol da lipoproteína de densidade baixa
LDL-pd	- LDL pequena e densa
LDL-r	- receptor de LDL
LH	- lipase hepática
LPL	- Lipoproteína lipase
Lp(a)	- Lipoproteína (a)
mg/dL	- miligrama por decilitro
mmol/L	- milimol por litro
nm	- nanômetro
NHipTRI	- não hipertrigliceridêmico
PL	- fosfolídeos
PL- ¹⁴ C	- fosfolídeos marcado com carbono 14
PLTP	- proteína de transferência de fosfolídeos
PON	- paraoxonase / aril-esterase
Qm	- quilômícron
SR-B1	- receptor <i>scavenger</i> classe B tipo 1
TG	- triglicerídeos
VLDL	- lipoproteína de densidade muito baixa
VLDL-C	- colesterol da lipoproteína de densidade muito baixa
β-VLDL	- beta VLDL

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Metabolismo das lipoproteínas contendo apoproteína B (apoB). Fonte: modificado de Borén et al. (2012, fig. 1)	16
Figura 2	Formação e modelamento da HDL	19
Figura 3	Metabolismo das lipoproteínas e transporte reverso do colesterol. Fonte: Rader and Daugherty (2008, fig. 2)	20
Figura 4	Fatores de risco para aterosclerose	34
Figura 5	Atividade da PON nos grupos estudados	38
Figura 6	Tamanho da partícula HDL nos grupos estudados	39
Figura 7	Razão HDL-C/apoA nos grupos estudados	40
Figura 8	Percentual de incorporação de PL- ¹⁴ C na HDL, em relação ao plasma total	41
Figura 9	Correlação linear entre atividade da PON e nível sérico de apoA	42
Figura 10	Correlação linear entre atividade da PON e nível sérico de apoB	43
Figura 11	Correlação linear entre percentual de incorporação de PL- ¹⁴ C e o nível sérico de apoB	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ocorrência dos fatores de risco para DAC estratificada nos grupos estudados.	35
Tabela 2	Tabela 2 - Determinações laboratoriais gerais e parâmetros de avaliação das funções hepática e renal	36
Tabela 3	Tabela 3 - Atividade da PON, incorporação de PL na HDL, tamanho da partícula HDL e marcadores do perfil lipídico	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Epidemiologia das doenças cardiovasculares	13
1.2 Lipoproteínas, triglicerídeos e doenças cardiovasculares	13
1.3 Lipoproteínas: vias exógena e endógena	14
1.4 Lipoproteínas: enzimas e proteínas de transferência	17
1.5 Aterosclerose, HDL e transporte reverso do colesterol (TRC)	18
1.6 Hipertrigliceridemia e o risco para aterosclerose	21
1.7 Relevância	23
2. HIPÓTESE	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Geral	25
3.2 Específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1 Desenho do estudo e casuística	26
4.2 Casuística e métodos	26
4.3 Critérios de seleção dos indivíduos	27
4.3.1 Critérios de inclusão	27
4.3.2 Critérios de exclusão	27
4.4 Determinações no laboratório clínico	28
4.5 Níveis séricos de apoA e apoB	28
4.6 Atividade da paraoxonase / aril-esterase (PON).....	28
4.7 Tamanho das partículas de HDL	29
4.8 Incorporação de fosfolipídeos	30
4.9 Análises estatísticas	32

4.9.1 Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de <i>Tukey-Kramer</i>	32
4.9.2 Teste de <i>Kruskal Wallis</i> seguido do teste de comparações múltiplas de <i>Dunn</i>	33
4.9.3 Teste de correlação linear de Pearson e Spearman	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Características epidemiológicas da população estudada	34
5.2 Comparação de dados obtidos das determinações laboratoriais entre os grupos	36
5.3 Análise de correlação linear	42
6. DISCUSSÃO	45
6.1 Limitações do estudo	50
7. CONCLUSÃO	52
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	53
9. REFERÊNCIAS	54
ANEXO 1. Modelo de termo de consentimento livre e pré-esclarecido	65
ANEXO 2. Modelo do questionário aplicado aos pacientes	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das doenças cardiovasculares

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as principais causas de morte no mundo são as doenças cardiovasculares (DCV), responsáveis por 23,6% dos óbitos mundiais. Nos países desenvolvidos e em desenvolvimento este número sobe para 24,3% e 25,5%, respectivamente. Nos países subdesenvolvidos as DCV figuram como a quarta principal causa de morte, perdendo para as infecções pulmonares, diarreias infecciosas e para síndrome de deficiência imunológica adquirida (AIDS) (WHO, 2011). Dados da Organização Mundial de Saúde de 2008 mostram que 7,3 milhões de pessoas morreram por doença isquêmica cardíaca e 6,2 milhões por acidente vascular cerebral ou outras doenças cerebrovasculares. Juntos estes óbitos representam aproximadamente 24% das causas de morte daquele ano no mundo (WHO, 2008). Em 2009, no Brasil, 31,8% das causas de morte foram em decorrência de doenças do aparelho circulatório (DATASUS, 2012). A aterosclerose é o principal processo inflamatório crônico que leva ao estabelecimento das DCV como as doenças isquêmicas cardíacas e doenças cerebrovasculares (MENDIS et al., 2011).

O risco de desenvolver a aterosclerose está ligado ao efeito global de vários fatores como: o uso de tabaco, inatividade física, alimentação inadequada, uso nocivo do álcool, hipertensão, diabetes, níveis elevados de lipídios no sangue, dentre outros (MENDIS et al., 2011).

1.2 Lipoproteínas, triglicerídeos e doenças cardiovasculares

O risco de desenvolver DCV está relacionado com os níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos, os quais são transportados no plasma como componentes das partículas lipoproteicas ou lipoproteínas (LIMA e COUTO, 2006). As lipoproteínas são separadas em classes, por suas densidades, pelo tamanho e pela composição lipídica e protéica

(FORTI and DIAMENT, 2006). As principais são: 1- Quilomicrons (Qm) que apresenta densidade (d) menor que 1,006 g/mL; 2- lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) com d entre 0,950 e 1,006 g/mL; 3- lipoproteína de densidade baixa (LDL) com d entre 1,006 e 1,063 e 4- lipoproteína de densidade alta (HDL) com d entre 1,063 e 1,210 g/dL. De 60% a 70% do colesterol plasmático encontra-se como colesterol componente da LDL (LDL-C) (HOBBS et al., 2002). O metabolismo do colesterol (transporte, captação e excreção) está ligado ao metabolismo das lipoproteínas, as quais são consideradas marcadores de risco para as DCV. Gordon e colaboradores (1989) encontraram que cada aumento de 1mg/dL (0,026 mmol/L) na concentração do colesterol contido na HDL (HDL-C) estava associado à diminuição no risco de futura doença coronariana de aproximadamente 2% em homens e 3% em mulheres. O nível sérico do HDL-C é considerado forte e independente fator de risco inverso para as DCV (ASSMANN et al., 1996; BALLANTYNE and HOOGEVEEN, 2003). O mecanismo de ação dos triglicerídeos (TG) aumentando o risco para DCV ainda não está bem esclarecido, mas evidências apontam para níveis elevados de TG, determinados no jejum ou não, como importante fator de risco para DCV (KANNEL and VASAN, 2009).

1.3 Lipoproteínas: vias exógena e endógena

As partículas lipoproteicas são formadas na sua parte central por lipídeos neutros - colesterol esterificado (CE) e TG - circundada por uma monocamada de lipídeos polares – fosfolipídeos (PL) e colesterol não esterificado ou colesterol livre (CL) – além das apoproteínas. Os Qm são as maiores e menos densas das partículas, são ricas em TG, com origem intestinal e alimentar (exógena). As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) são também ricas em TG, mas têm origem hepática (endógena). O metabolismo plasmático da VLDL leva a formação de partículas intermediárias (IDL) também chamadas de beta-VLDL (β -VLDL), que pela ação das enzimas plasmáticas perdem

conteúdo lipídico, diminuindo o tamanho, até a formação das lipoproteínas de densidade baixa (LDL). Já as lipoproteínas de densidade alta (HDL) apresentam outra origem metabólica; são formadas a partir do fígado ou do intestino, num processo separado das VLDL e LDL. As HDL são as menores e mais densas das lipoproteínas (FORTI and DIAMENT, 2006; LIMA e COUTO, 2006). Além das citadas temos a lipoproteína (a) - Lp(a), uma LDL que possui apoproteína (a) [apo (a)], com ação metabólica menos conhecida (SPOSITO et al., 2007).

O conteúdo proteico das lipoproteínas é formado pelas apoproteínas e algumas enzimas a elas ligadas. Nos Qm a proteína estrutural é a apoproteína B-48 (apoB-48); nas classes VLDL, LDL e Lp(a) é a apoproteína B-100 (apoB-100). Nas HDL são as apoproteínas apoA-I e apoA-II. As apoproteínas têm várias funções metabólicas como: a formação intracelular das lipoproteínas (apoB-100, B-48 e após A-I e A-II); ligantes aos receptores das membranas celulares (apo B-100 e apoE), além de atuarem como co-fatores enzimáticos, a exemplo das apoA-I, apoC-II e apoC-III (SPOSITO et al., 2007).

Na via exógena do metabolismo lipídico, logo após a ação da lipase pancreática, moléculas de ácidos graxos livres mono e di-acil glicerol, absorvidos pelos enterócitos, são reagrupadas junto a uma molécula de apoB-48 e circundadas por uma monocamada de fosfolípidos formando os Qm. No plasma os Qm adquirem apoC-II e apoE, sofrem a ação imediata da enzima lipoproteína lipase (LPL), ativada pela apoC-II, que diminui seus conteúdos lipídicos. A hidrólise dos TG pela LPL gera ácidos graxos livres que são rapidamente utilizados como combustível nos músculos e coração ou serão armazenados novamente como TG nos tecidos adiposos. Alguns Qm remanescentes que se mantêm na circulação são captados no fígado, via receptor de proteína relacionada com LDL (LDL-RP-r), e o seu conteúdo será reutilizado ou excretado (Figura 1) (BORÉN et al., 2012; BOULLART et al., 2012).

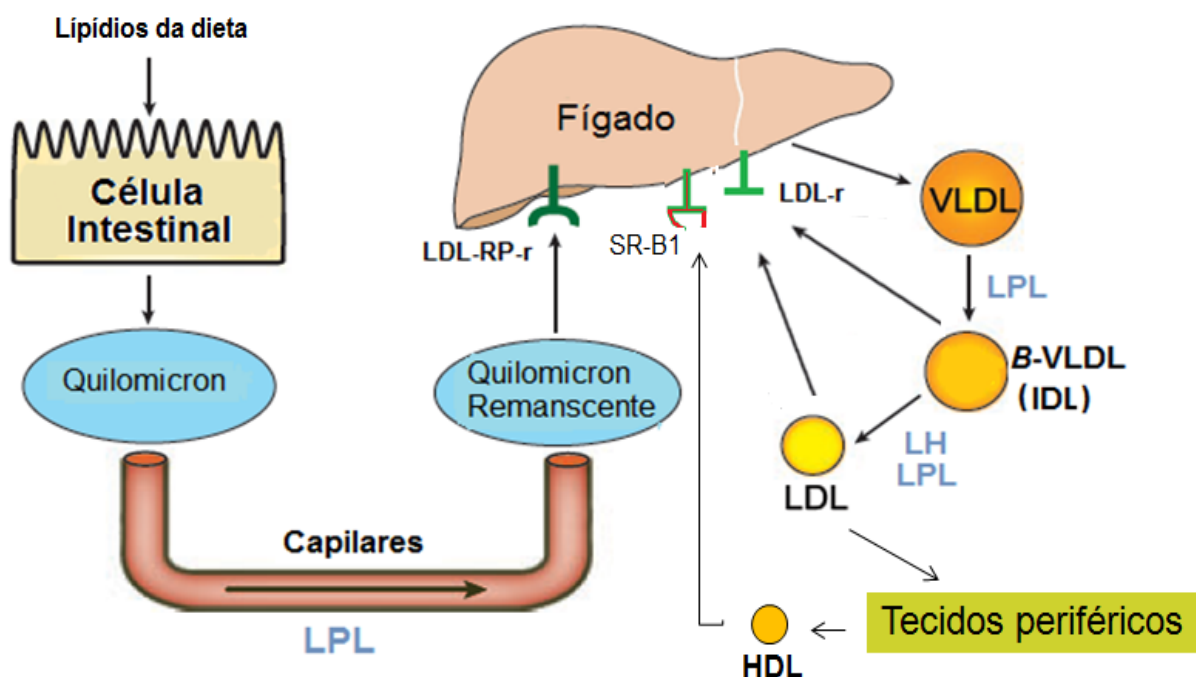


Figura 1: Metabolismo das lipoproteínas contendo apoproteína B (apoB). LDL-RP-r = receptor de proteína relacionada com LDL; LDL-r = receptor de LDL.

Fonte: modificado de Borén et al., 2012.

Já na via endógena, parcialmente demonstrado na figura 1, as VLDL são montadas nos retículos endoplasmáticos dos hepatócitos e secretadas para a circulação. São formadas basicamente por TG, colesterol, PL e uma molécula de apoB-100 para cada partícula VLDL (BOULLART et al., 2012). No plasma a VLDL sofre ação da LPL, da lipase hepática (LH), além das proteínas de transferência de éster de colesterol (CETP) e proteína de transferência de fosfolipídeos (PLTP), processo pelo qual as VLDL diminuem seu conteúdo de TG e PL, dando origem às VLDL remanescentes (β -VLDL), dentre estas a lipoproteína de densidade intermediária (IDL). Em continuidade as β -VLDL podem ser captadas pelo fígado e metabolizadas, ou originar as LDL, que permanecem maior tempo na circulação. A LDL é a principal partícula transportadora do colesterol proveniente do fígado para os tecidos periféricos, já o transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é feito pela HDL (LIMA e COUTO, 2006). Portanto, o metabolismo do colesterol é representado pelo metabolismo das partículas lipoproteicas com a modulação de proteínas e enzimas relacionadas.

1.4 Lipoproteínas: enzimas e proteínas de transferência

Das várias enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol destacam-se as que agem na interação de partículas lipoprotéicas: lipase hepática (LH) e lipoproteína lipase (LPL), com ação no catabolismo de TG e CE; a lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) que atua no processo de esterificação do CL, com apoA1 como co-fator (AZEVEDO et al., 2001); a proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), que catalisa a transferência do CE entre as partículas lipoproteicas; e a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) com ação, observada *in vitro*, na transferência de PL e CL das lipoproteínas de menores densidades (VLDL, β -VLDL e LDL) para as HDL (NUNES et al., 2001; CHEUNG et al., 2009). A PLTP também atua na transferência de PL entre as subclasses da HDL, o que talvez seja sua principal ação antiaterogênica (FOGER et al., 1997), participando da modulação do tamanho e da composição lipídica das HDL (LIE et al., 2004; CHEN et al., 2009). Essa mesma proteína de transferência pode ainda estar envolvida no efluxo de fosfolípidos e colesterol livre originados nas células endoteliais (LIE et al., 2004).

Outra proteína importante no metabolismo das lipoproteínas, com impacto direto no metabolismo do colesterol, é a paraoxonase / aril-esterase (PON), enzima sintetizada no fígado que, no plasma circula associada às HDL (COSTA et al., 2005; LIMA e COUTO, 2006). A PON recebe este nome porque para determinar sua atividade é muito utilizado como substrato o Paraoxon, um metabólito tóxico do inseticida *parathion* (DURRINGTON et al., 2001; COSTA et al., 2005). Nesse metabolismo a PON atua inibindo a oxidação de lipídeos superficiais tanto das LDL quanto das HDL (COSTA et al., 2005). A oxidação das LDL (LDL modificadas) na parede dos vasos está relacionada ao início do processo inflamatório da aterosclerose (LIMA e COUTO, 2006). O estudo de Napoli e colaboradores (1997) mostrou que acúmulo de LDL oxidadas precede a entrada dos monócitos na parede das artérias, e os macrófagos foram encontrados em maior número

nos sítios onde havia maior quantidade de LDL oxidadas. A ação da HDL prevenindo a oxidação e inativando os fosfolipídeos já oxidados da LDL, na parede dos vasos, está ligada à ação da PON (COSTA et al., 2005; LIMA e COUTO, 2006), o que torna também a determinação da atividade da PON, quando estudada junto a HDL, um marcador de risco para DCV.

1.5 Aterosclerose, HDL e transporte reverso do colesterol (TRC)

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica progressiva, que tem como processo inicial o depósito e a oxidação da lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na parede das artérias (LIMA e COUTO, 2006). A oxidação dos lipídeos superficiais da LDL depositada estimula as células endoteliais a liberarem fatores quimioatraentes para monócitos (NAVAB et al., 2004). Como consequência, há acúmulo de macrófagos na íntima da parede arterial, que expressam vários receptores *scavenger*, alguns dos quais tem a habilidade de se ligar e internalizar a LDL oxidada levando à formação das células espumosas, as quais vão aumentando em número gradativamente e culminam com a formação da placa de ateroma, iniciando a doença aterosclerótica (BARTER et al., 2004; NAVAB et al., 2004).

Com atividade anti-aterosclerótica, a classe HDL é representada por uma população de partículas heterogêneas, com tamanho, densidade, conteúdo proteico e atividade anti-aterogênica diferentes (XU and FU, 2003; FORTI and DIAMENT, 2006; JIA et al., 2006). No processo de formação das HDL (Figura 2), a partícula inicial, à medida que ganha colesterol esterificado no seu núcleo e PL na camada externa, pela ação das LCAT e PLTP, forma subclasses de partículas com tamanhos gradativamente maiores, na sequência: pré β -HDL (pré β ₁-HDL e pré β ₂-HDL), HDL₃ (HDL_{3c}, HDL_{3b}, HDL_{3a}) e HDL₂ (HDL_{2a} e HDL_{2b});

e pela ação da LH faz a interconversão entre as subclasses (XU and FU, 2003; JIA et al., 2006; LIMA e COUTO, 2006; TIAN et al., 2011).

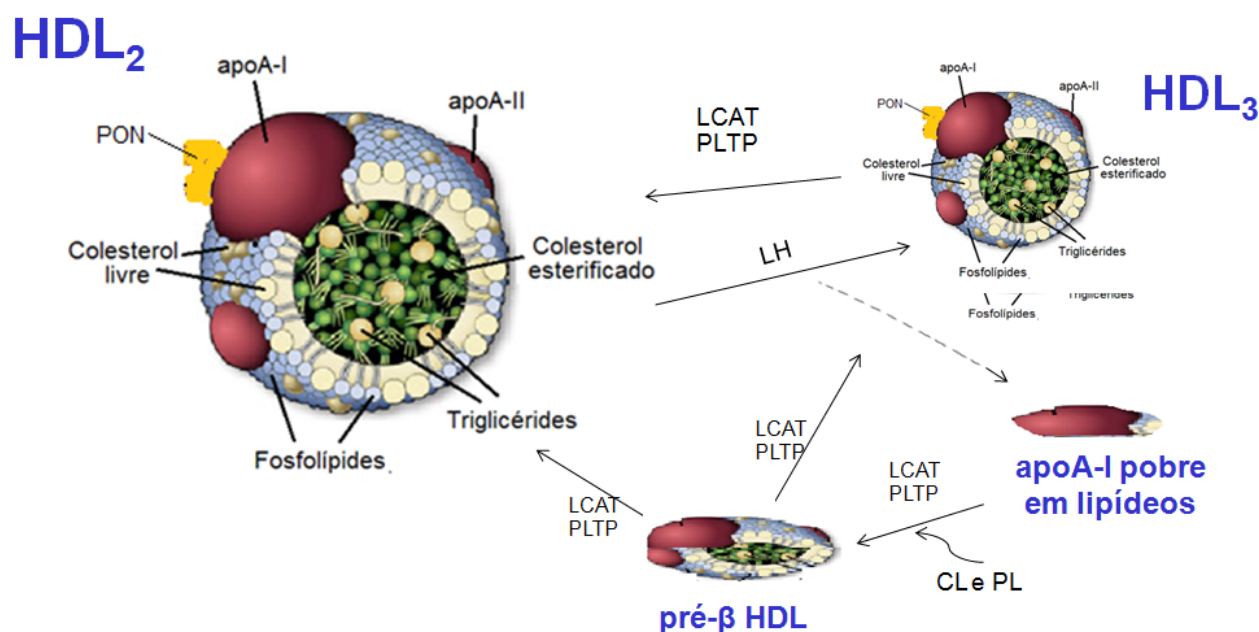


Figura 2: Formação e remodelamento da HDL com representação das principais subclasses da HDL e atuação das proteínas envolvidas. apoAI = apoproteína AI; CL = colesterol livre; LCAT= lecitina colesterol aciltransferase; PLTP = proteína de transferência de fosfolípidos; LH = lipase hepática; PL = fosfolípidos; PON = paraoxonase.

Transportar o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde será reutilizado ou excretado, conhecido por Transporte Reverso do Colesterol (TRC), é considerada a principal ação antiaterogênica da HDL (BARTER et al., 2003; FORTI and DIAMENT, 2006; LIMA e COUTO, 2006). No início (Figura 3), as apoA I e II, que são sintetizadas em sua maioria pelos hepatócitos, mas também têm origem intestinal, recebem colesterol livre e fosfolípidos das membranas celulares originando HDL nascentes (pré-β-HDL), num processo dependente do transportador da membrana conhecido como *ATP binding cassette transporter A1* (ABCA-1) (FORTI and DIAMENT, 2006; RADER and DAUGHERTY, 2008). As pré-β-HDL, gradativa e passivamente adquirem CL e PL das células dos tecidos periféricos e, sob ação da LCAT, o colesterol é esterificado e internalizado na partícula formando a HDL madura. Ainda na circulação a CETP catalisa

o transporte de CE da HDL para outras partículas lipoproteicas, principalmente para as β -VLDL e LDL, mas também entre as diferentes subclasses da HDL (FORTI and DIAMENT, 2006; TIAN et al., 2011). No mesmo processo TG são transferidos das VLDL e β -VLDL para a HDL (BREWER et al., 2004).

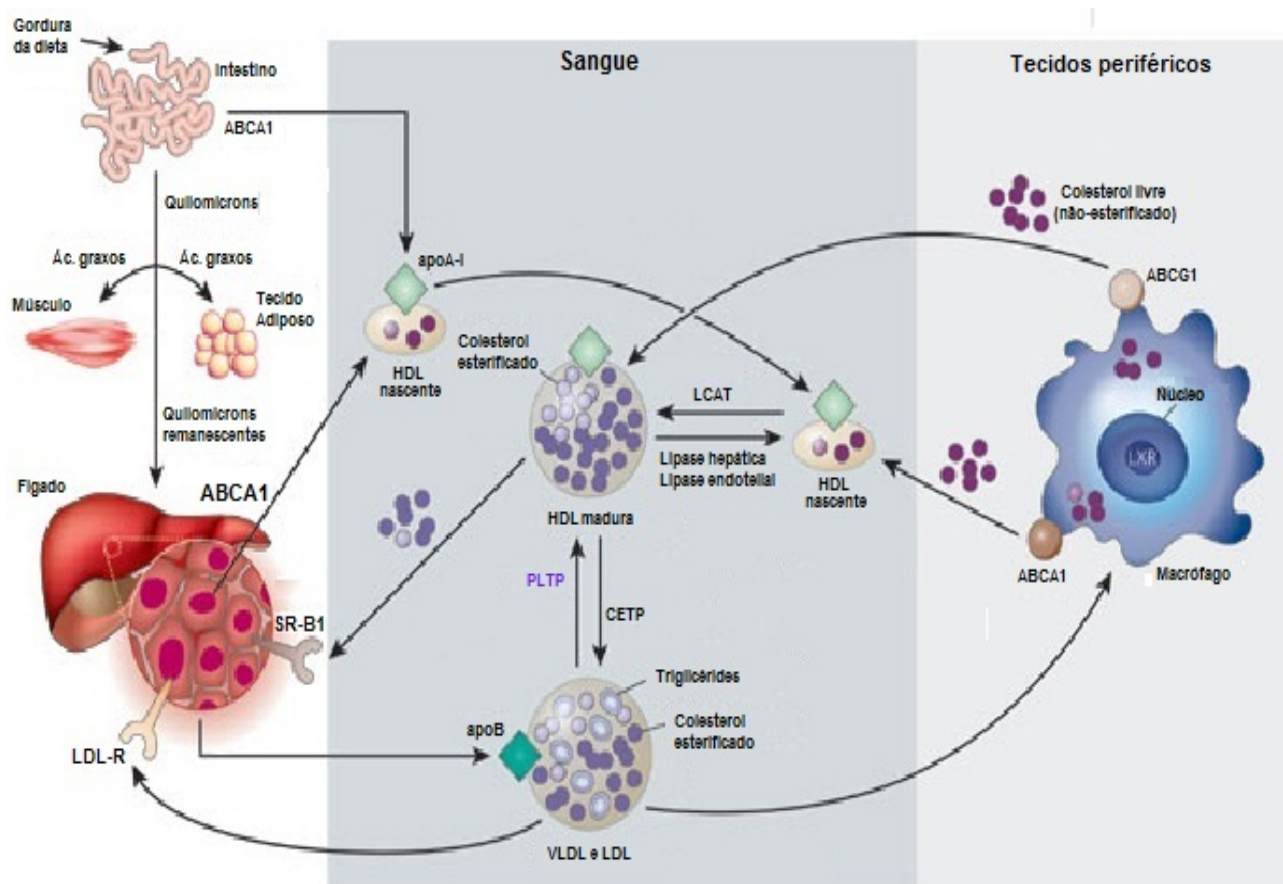


Figura 3 – Metabolismo das lipoproteínas e transporte reverso do colesterol.

Fonte: modificado de Rader and Daugherty (2008). Inclusão e identificação das proteínas e enzimas: LCAT = lecitina colesterol aciltransferase; lipase hepática; lipase endotelial; PLTP = proteína de transferência de fosfolipídeos; CETP = Proteína de transferência de colesterol esterificado.

Atuando paralela e simultaneamente, a PLTP catalisa a transferência de PL entre as subclasses de HDL e também das VLDL/ β -VLDL para as HDL (CHEUNG et al., 2009). Encerra o TRC com a captação das HDL pelo fígado, através dos receptores *scavenger* classe B tipo 1 (SR-B1); e das β -VLDL e LDL, em condições fisiológicas, por receptores de LDL (LDL-r) (RADER and DAUGHERTY, 2008; AZEVEDO, 2011; SANTOS, 2011). O

colesterol, então, pode recircular como conteúdo de nova VLDL formada no fígado, ou ser excretado pela bile (AZEVEDO et al., 2011).

1.6 Hipertrigliceridemia e o risco para aterosclerose

Doenças como hipertrigliceridemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada, quilomicronemia familiar, dentre outras aparecem como causas primárias da hipertrigliceridemia crônica. Porém as causas mais comuns de hipertrigliceridemia crônica são a síndrome metabólica e diabetes tipo 2. O excesso de triglicerídeo plasmático pode estar relacionado a aumento na produção, redução do seu catabolismo ou ambos (BERGLUND et al., 2012). Jacobson e colaboradores (2007) citam que numa meta-análise de 21 estudos prospectivos de base populacional, que envolviam um total de 65.863 homens e mulheres, encontrou que cada 89 mg/dL (1 mmol/L) de aumento nos níveis de TG plasmático foi associado com um aumento de 12% no risco para DCV, após ajuste estatístico com outros parâmetros (CT, LDL-C, HDL-C, pressão sanguínea, diabetes e índice de massa corpórea), indicando que o nível de TG constitui um fator de risco independente para DCV. O TG plasmático se mostra como a soma da quantidade produzida no fígado, veiculado nas VLDL, com a quantidade adquirida pela via exógena, na alimentação, pertencente aos Qm (KANNEL and VASAN, 2009). O aumento do risco para DCV na hipertrigliceridemia parece estar ligado aos efeitos aterogênicos de lipoproteínas ricas em TG remanescentes com origem no metabolismo das VLDL e Qm, após ação das lipase lipoproteica e lipase hepática (JACOBSON et al., 2007). O aumento do TG no plasma está relacionado à redução nas concentrações de HDL-C e também ao aumento de produção das lipoproteínas aterogênicas, ricas em triglicerídeos, como as VLDL e β -VLDL, que levarão à formação da LDL pequena e densa, a mais aterogênica das lipoproteínas (BERNEIS and KRAUSS, 2002; KANNEL and VASAN,

2009). A LDL pequena e densa parece apresentar menor afinidade aos receptores de LDL no fígado, o que dificulta sua depuração e aumenta sua meia-vida plasmática. Também apresentam maior capacidade de penetração na parede dos vasos sanguíneos (BERNEIS and KRAUSS, 2002). O tamanho da partícula de LDL é inversamente relacionado à concentração do TG plasmático (BOULLART et al., 2012). MARUYAMA e colaboradores (2003) propõem que quando a razão TG/HDL-C > 1 estima-se a presença de partículas de LDL pequenas e densas. Indivíduos com a mesma concentração de LDL-C terão maior risco de aterosclerose aqueles que apresentarem hipertrigliceridemia, em função da presença de partículas de LDL pequenas e densas (BERNEIS and KRAUSS, 2002). Já a razão HDL-C/apoA estima a concentração relativa de colesterol incorporado no core da partícula de HDL (BRINTON et al., 1994).

1.7 Relevância

Embora a aterosclerose tenha sua patogênese atribuída a causas multifatoriais, os principais marcadores de risco para esta doença estão relacionados a alterações nas concentrações séricas de moléculas componentes das lipoproteínas. Na hipertrigliceridemia ocorre enriquecimento de triglicerídios nas lipoproteínas e aumento na quantidade de partículas remanescentes de LDL com menores diâmetros. Partículas de LDL menores e redução da concentração de HDL-C frequentemente coexistem em situação de hipertrigliceridemia e apresentam relação direta com o aumento do risco de eventos cardiovasculares.

A atividade da PON, relacionada ao início do processo aterosclerótico e a capacidade de incorporação de fosfolipídios, relacionado ao remodelamento da HDL e ao transporte reverso do colesterol são marcadores de risco para DCV e podem estar alteradas na hipertrigliceridemia.

2. HIPÓTESE

Em condições de hipertrigliceridemia existe impacto nas atividades da PON e na capacidade de incorporação de PL na HDL, interferindo na atividade antiaterogênica da partícula.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as atividades da PON e da PLTP, esta a partir da incorporação de fosfolipídios, e suas influências no remodelamento das partículas de HDL em relação à hipertrigliceridemia.

3.2 Específicos

- Determinar o tamanho das partículas de HDL;
- Determinar a atividade da PON;
- Inferir alterações no remodelamento plasmático da partícula de HDL a partir da incorporação de fosfolipídeos.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Estudo de corte transversal com amostragem por conveniência.

4.2 Casuística e métodos

Foram avaliados, prospectivamente, 66 indivíduos do sexo masculino, com idade entre 32 e 75 anos, com média de 51,08 anos, selecionados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Naval de Salvador e no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Os indivíduos do estudo foram subdivididos em dois grupos: Grupo 1: não-hipertrigliceridêmicos; Grupo 2: hipertrigliceridêmicos, este estratificado em dois níveis: HDL-C menor que 40mg/dL e HDL-C maior ou igual a 40mg/dL. Os pacientes foram considerados hipertrigliceridêmicos quando apresentaram nível plasmático de triglicerídeos igual ou acima de 150mg/dL. Os indivíduos foram convidados a participar do estudo, quando os mesmos se cadastravam para a realização de exames associados às solicitações de seus médicos assistentes. Após a concordância foram preenchidos e assinados os termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Em entrevista os indivíduos forneceram informações sobre hábitos de vida e condições de saúde. Foram considerados sedentários aqueles indivíduos que negaram a prática de pelo menos três vezes por semana, em sessões de 30 a 60 minutos, algum exercício aeróbico (SPOSITO, 2007). Foram considerados etilistas os indivíduos que relataram ingerir álcool de uma a quatro vezes por semana (BRINTON, 2012). Foram considerados hipertensos os que apresentavam as seguintes condições: utilizavam alguma medicação anti-

hipertensiva ou referiam a doença. Os indivíduos foram considerados diabéticos quando utilizavam medicação hipoglicemiante e/ou referiam a doença, ou quando apresentavam glicemia aumentada na determinação laboratorial. As amostras destinadas aos exames ambulatoriais dos pacientes foram também aproveitadas para os ensaios deste projeto, portanto, não foram realizadas coletas adicionais de amostras somente para a este estudo.

Este projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira da UFBA (CEP/MCO/UFBA), ofício nº 379, ref. V/Of. nº 02/2005, 27/09/2005 e, Parecer/Resolução Aditiva nº 075/2011.

4.3 Critérios de seleção dos indivíduos

4.3.1 Critérios de inclusão

- Pacientes do sexo masculino, com idade entre 40 e 75 anos;
- Preenchimento e assinatura do TCLE com o aceite em participar da pesquisa;
- Pacientes ambulatoriais (não internados).

4.3.2 Critérios de exclusão

- Pacientes internados para qualquer tratamento;
- Não preenchimento do TCLE;
- Portadores de qualquer doença aguda;
- Portadores de disfunção renal (creatinina sérica > 2,0 mg/dL e ou proteinúria > 3,0 g/L e albumina sérica < 3,0 g/L).
- Indivíduos com relato de consumo excessivo de álcool (acima de 4 vezes por semana).

4.4 Determinações no laboratório clínico

Foram determinadas as concentrações de colesterol total (CT) e suas frações, e triglicerídeos (TG), nas amostras de soro obtidas após jejum de 12-14 horas. O HDL colesterol (HDL-C) foi determinado por método homogêneo direto, no equipamento LabMax 240 – LabTest (Labtest, Brasil). As concentrações do colesterol de VLDL e LDL foram calculadas pela fórmula de FRIEDEWALD (1972) utilizando conjuntos diagnósticos obtidos na indústria nacional e/ou internacional. Foram também utilizados métodos enzimáticos convencionais (Labtest, Brasil) nas determinações de AST, ALT, ureia, creatinina, proteínas totais e frações.

4.5 Níveis séricos de apoA e apoB

As apoA e apoB foram determinadas por imunonefelometria cinética utilizando o analisador automatizado IMMAGE® (BeckmanCoulter, USA), a partir da taxa de variação da dispersão da luz causada por aumento no número de partículas em suspensão.

4.6 Atividade da paraoxonase / aril-esterase (PON)

Para determinação da atividade da PON foi utilizado método descrito por Mackness e colaboradores (1991) 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 et al., 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, 2 mMolar de CaCl₂ e 1,1

mMolar 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, a média da variação das absorbâncias foi multiplicada por fator, conforme abaixo.

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

VTR - Volume total da reação

VA – Volume da amostra

E – Espessura da parede da placa ($\epsilon_{405} = 1805 L M^{-1} cm^{-1}$)

Então a atividade da PON = Fator x $\Delta abs/min$

4.7 Tamanho das partículas de HDL

O tamanho das partículas de HDL foi determinado em cooperação com o Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da USP-São Paulo – InCor-HCFM/USP. Utilizando o método de espalhamento de luz no equipamento *Laser Light Scattering* (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp. USA), após separação por precipitação das partículas lipoproteicas e seus remanescentes que contêm apoB por adição da solução de polietilenoglicol 8000 (200g/L). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,15M contendo EDTA 0,01% (pH 7,5). A solução resultante foi filtrada por membrana Millipore com 0,22 micra de porosidade. O diâmetro (nm) das partículas da HDL em solução foi determinado por coleta das leituras obtidas em ângulo de 90°, e calculada utilizando o software Big Particle Sizing, versão 2,34 (Brookhaven Instr. Corp., Hotsville, NY, USA); sendo os

resultados expressos pela média obtida de 5 leituras de 2 minutos cada (LIMA and MARANHÃO, 2004).

4.8 Incorporação de fosfolipídeos

A incorporação de fosfolipídeos foi determinada a partir dos dados de contagem de cintilação dos fosfolipídeos marcados com carbono 14 (PL-¹⁴C) na amostra total, em comparação à cintilação da fração da amostra que contém somente a HDL (após precipitação). Este método *in house*, foi desenvolvido com base no princípio do método do substrato exógeno (STOKKE and NORURN, 1971; CHANNON et al., 1990), ou seja, para cada amostra, 1,0 (um) microlitro de PL-¹⁴C (cerca de 0,4 μ Ci/mL) foi adicionado em 500 microlitros de soro e, após homogeneizado em vortex, submetidos à temperatura de 0 – 4°C (temperatura que se espera a inatividade da PLTP) por uma hora, visando estabelecer o equilíbrio entre PL endógeno da amostra e o PL-¹⁴C adicionado. Decorrido este tempo, incubou-se à 37°C (temperatura onde a PLTP é ativa), sob agitação constante, por uma hora. Após este tempo esfriou-se a amostra em banho de água com gelo para paralisar a reação. 250 microlitros deste soro marcado foram separados para leitura de fundo (radioatividade total de cada amostra). Nos outros 250 microlitros da amostra marcada foram adicionados 250 microlitros de reagente precipitante preparado previamente com sulfato de dextran 0,2% e MgCl₂ 3,0 Molar v/v, para precipitar as lipoproteínas que contém apoB. Em seguida, centrifugou-se, sob refrigeração, por 10 minutos a 3.000 rpm (1.600xG) e separou-se o sobrenadante, que contém HDL, para posterior determinação da radioatividade presente. Para a determinação das radioatividades nas amostras foi utilizado o equipamento para detecção da cintilação líquida (Multilabel Detection Platform - Hidex Chamaleon). Cada amostra foi dividida em cinco alíquotas de 50 microlitros. Em placas de ELISA com 96 poços, tomando o cuidado

de utilizar poços intercalados para evitar interferências entre as amostras, em cada poço foram adicionados uma das alíquotas de 50 microlitros e 250 microlitros de solução cintiladora Ultima Gold (High flash-point LSC-cocktail for counting aqueous and non-aqueous samples – PerkinElmer, Inc, Waltham, USA). A incorporação de PL foi expressa como percentual de PL-¹⁴C a partir das contagens por minuto obtidas no equipamento de leitura de cintilação líquida, em uma hora, em relação à radioatividade total adicionada na amostra.

4.9 Análises Estatísticas

A análise estatística foi dividida em dois momentos, descritiva e inferencial utilizando o software GraphPad Prism 5.01(USA). Para a análise descritiva, além das estimativas de centralidade e dispersão, foi realizado o teste de normalidade de D'Agostino para avaliar o tipo de distribuição dos dados. Em seguida, com base nas informações, para os dados com distribuição normal foram utilizados testes paramétricos, quando a distribuição não apresentou padrão de normalidade foram utilizados testes não-paramétricos. Os dados analisados foram considerados significativos quando $p < 0,05$ para intervalo de confiança de 95%. Foi realizado teste de *Grubb* para detecção de *outlier* por grupo de variáveis estudadas. Todas as análises estatísticas inferenciais de comparação e correlação foram “estatísticas em coluna”.

4.9.1 Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey-Kramer*

A análise de variância seguida do teste de *Tukey-Kramer* foi utilizada para comparar a diferença entre as médias e desvios dos dados determinados e calculados, com homocedasticidade confirmada pelo teste de *Bartlett's*; entre os grupos: não-hipertrigliceridêmicos e hipertrigliceridêmico, estes em dois níveis, ou seja, subdivididos em hipertrigliceridêmicos com HDL menor que 40mg/dL, e hipertrigliceridêmicos com HDL igual ou maior que 40mg/dL.

4.9.2 Teste de *Kruskal Wallis* seguido do teste de comparações múltiplas de *Dunn*

Nos casos em que os dados apresentavam heteroscedasticidade, para comparação entre as médias e desvios, foram utilizados os testes não-paramétricos de *Kruskal-Wallis*, para análise em colunas, seguido do teste de comparação múltiplas de *Dunn*.

4.9.3 Teste de correlação linear de *Pearson* e *Spearman*

O coeficiente de correlação linear de *Pearson* foi aplicado para avaliar a correlação entre dois parâmetros diferentes no mesmo grupo quando os dados apresentavam homocedasticidade, nos parâmetros que os dados se mostravam heterocedásticos foi realizada a análise de correlação linear de *Spearman*.

5. RESULTADOS

5.1 Características epidemiológicas da população estudada

A figura 4 mostra o percentual dos principais fatores de risco identificados na população do estudo. Desses, foram identificados: sedentarismo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes e tabagismo, além de mostrar também o percentual de indivíduos que relatam ingerir bebida alcoólica, chamado aqui de etilismo, sem esclarecer a frequência e quantidade do uso de álcool. Os dados foram obtidos na entrevista com os indivíduos imediatamente antes da coleta das amostras.

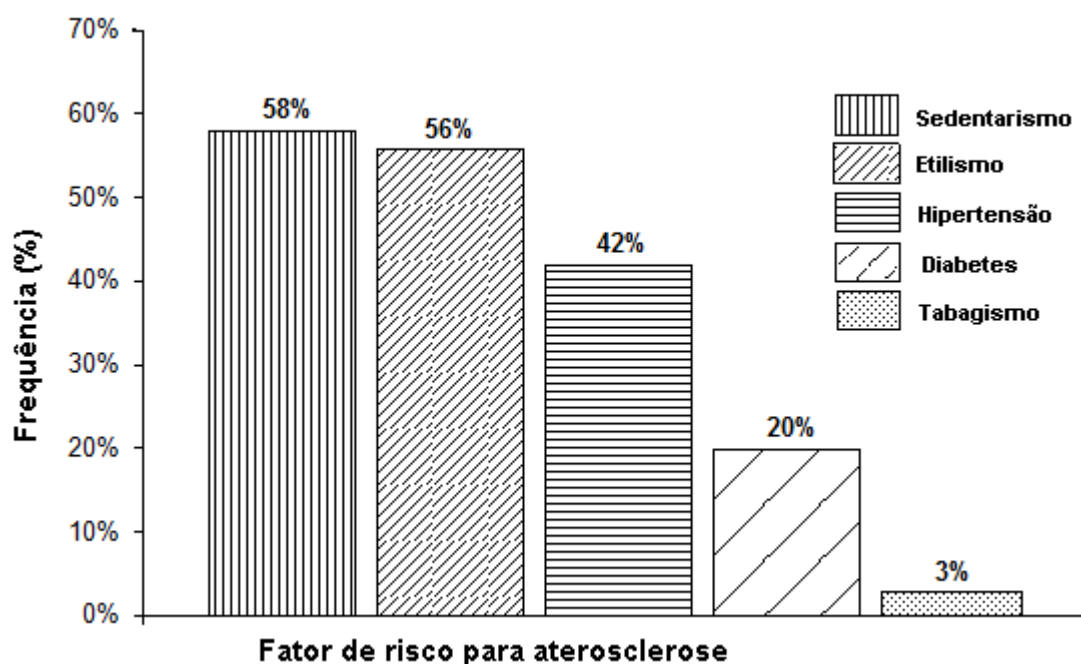


Figura 4- Fatores de risco para aterosclerose, obtidos após avaliação dos dados dos participantes. Etilismo: ingerir ou não bebida alcoólica, sem a preocupação de esclarecer a frequência e quantidade do uso de álcool. Sedentarismo: não praticar qualquer atividade física, por pelo menos meia hora, na frequência mínima de três vezes por semana. Hipertensão: informação do paciente, sem medição. Tabagismo: Informação do paciente.

A Tabela 1 mostra o percentual de ocorrência dos principais fatores de risco para DCV, identificados nos grupos estudados: não-hipertrigliceridêmicos (NHipTRI) e hipertrigliceridêmicos (HipTRI), os últimos estratificados em hipertrigliceridêmicos com HDL-C < 40mg/dL (HipTRI HDL<40) e hipertrigliceridêmicos com HDL-C ≥ 40mg/dL (HipTRI HDL-C ≥ 40). Mostrando maior prevalência de indivíduos diabéticos, sedentários e tabagistas no grupo HipTRI, principalmente em HipTRI HDL<40.

TABELA 1 – Ocorrência dos fatores de risco para DCV estratificada nos grupos estudados.

	NHipTRI % (n)	HipTRI HDL-C<40 % (n)	HipTRI HDL-C≥40 % (n)	HipTRI % (n)
Diabetes	15,4 (4)	34,8 (8)	18,2 (2)	29,4 (10)
Etilismo	61,5 (16)	42,9 (9)	60,0 (6)	48,4 (15)
Hipertensão	46,1 (12)	47,6 (10)	30,0 (3)	41,9 (13)
Sedentarismo	53,8 (14)	71,4 (15)	40,0 (4)	61,3 (19)
Tabagismo	0 (0)	9,5 (2)	0 (0)	6,4 (2)

Valores em percentual (dados sobrepostos). Teste estatístico exato de Fisher não significativo. (n) número de amostras; NHipTRI: pacientes sem hipertrigliceridemia; HiperTRI HDL-C < 40: pacientes com hipertrigliceridemia com valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL; HipTRI HDL-C ≥ 40: pacientes com hipertrigliceridemia com valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL; HipTRI: todos os pacientes com hipertrigliceridemia.

5.2 Comparação de dados obtidos das determinações laboratoriais entre os grupos

A Tabela 2 mostra a análise dos dados obtidos das determinações laboratoriais gerais e parâmetros de avaliação das funções hepática e renal dos 66 indivíduos do sexo masculino segundo idade e classificação por grupos: Não-hipertriglicidêmicos (NHipTRI) e Hipertriglicidêmicos (HipTRI), sendo esse último grupo estratificado em dois níveis, ou seja, HipTRI com valores de HDL-C < 40mg/dL e HipTRI com valores de HDL-C ≥ 40 mg/dL.

TABELA 2 - Determinações laboratoriais gerais e parâmetros de avaliação das funções hepática e renal entre os indivíduos não hipertriglicidêmicos e Hipertriglicidêmicos.

	NHipTRI	HipTRI	HipTRI	HipTRI
Número	26	25	15	40
Idade (anos)	52 ± 8	53 ± 10	47 ± 8	50 ± 10
CT	178 ± 33	190 ± 46	233 ± 52 *	209 ± 48 *
TG	95 ± 30	243 ± 67 *	231 ± 61 *	239 ± 64 *
HDL-C	47 ± 10	33 ± 4 *§	47 ± 7§	38 ± 9 *
LDL-C	112 ± 29	113 ± 38	140 ± 45	124 ± 42
VLDL-C	19 ± 6	46 ± 10 *	46 ± 12 *	46 ± 11 *
apoA	159 ± 21	137 ± 26 *§	180 ± 29 *§	154 ± 34
apoB	87 ± 18	105 ± 30 *	129 ± 27 *	115 ± 31 *
Uréia	29 ± 9,6	31 ± 7,8	28 ± 7,6	30 ± 7,8
Creatinina	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2
Glicose	101 ± 8,5	106 ± 14	101 ± 6,5	105 ± 13
AST	30 ± 7	30 ± 7	32 ± 9	31 ± 8
ALT	34 ± 8	32 ± 10	33 ± 11	34 ± 12

Valores em média ± desvio padrão em mg/dL. Teste estatístico *One Way* ANOVA, pós-teste de *Tukey-Kramer* ou *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn* quando a distribuição foi não-paramétrica. Foi atribuída diferença significativa entre os grupos quando $p < 0,05$, para intervalo de confiança de 95%. NHipTRI: pacientes sem hipertriglicidemia; HipTRI HDL-C < 40: pacientes com hipertriglicidemia e valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL; HipTRI HDL-C ≥ 40: pacientes com hipertriglicidemia e valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL; HipTRI: todos os pacientes com hipertriglicidemia. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo NHipTRI. (§) $p < 0,05$ entre os grupos HipTRI HDL-C < 40 e HipTRI HDL-C ≥ 40.

A Tabela 3 mostra determinações da atividade da PON, do tamanho de partícula da HDL, da Incorporação de PL na HDL, além de análise de alguns marcadores utilizados no diagnóstico e no controle do tratamento das dislipidemias como HDL-C/apoA e TG/HDL-C, segundo idade e classificação nos grupos: não-hipertrigliceridêmicos (NHipTRI) e hipertrigliceridêmicos (HipTRI), sendo esse último grupo estratificado em dois níveis, ou seja, HipTRI com valores de HDL-C < 40mg/dL e HipTRI com valores de HDL-C ≥ 40 mg/dL.

TABELA 3 – Atividade da PON, incorporação de PL na HDL, tamanho da partícula HDL e marcadores do perfil lipídico em indivíduos não-hipertrigliceridêmicos e hipertrigliceridêmicos.

	NHipTRI	HipTRI	HipTRI	HipTRI
Atividade da PON (nMol de p-nitrofenol/min/mL)	110 ± 66 (26)	105 ± 59 (23)	108 ± 54 (15)	106 ± 57 (40)
Tamanho da HDL (nm)	9,47 ± 0,75 (24)	9,64 ± 1,19 (21)	9,62 ± 0,69 (14)	9,63 ± 1,01 (35)
Incorporação PL (HDL/Plasma Total)	0,44 ± 0,20 (12)	0,52 ± 0,08 (13)	0,48 ± 0,15 (11)	0,50 ± 0,1 (24)
HDL-C / apoA	0,29 ± 0,05 (26)	0,24 ± 0,05 (23)*	0,26 ± 0,03 (14)*	0,25 ± 0,05 (38)*
TG / HDL-C	2,18 ± 0,97 (26)	8,33 ± 4,17 (23)*	5,05 ± 1,58 (15)*	6,16 ± 1,93 (36)*

Valores em média ± desvio padrão em mg/dL, (n) número de amostras analisadas. Teste estatístico *One Way* ANOVA, pós-teste de *Tukey-Kramer* ou *Kruskal-Wallis*, pós-teste de *Dunn* quando a distribuição foi não-paramétrica. Foi atribuída diferença significativa entre os grupos quando $p < 0,05$ (*), para intervalo de confiança de 95%. NHipTRI: pacientes não hipertrigliceridêmicos; HipTRI HDL-C < 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL; HipTRI e HDL-C ≥ 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL; HipTRI: todos os pacientes com hipertrigliceridemia.

A comparação da atividade da enzima PON nos diferentes grupos é mostrada na figura 5. Não houve diferença entre os grupos para a atividade da PON ($p=0,9484$). Os dados de atividade (nMol de *p*-nitrofenol/mL/min) são descritos por média \pm desvio padrão para: NHipTRI (110 \pm 66), HipTRI HDL-C < 40 mg/dL (105 \pm 59) e HipTRI HDL-C \geq 40 mg/dL (108 \pm 54).

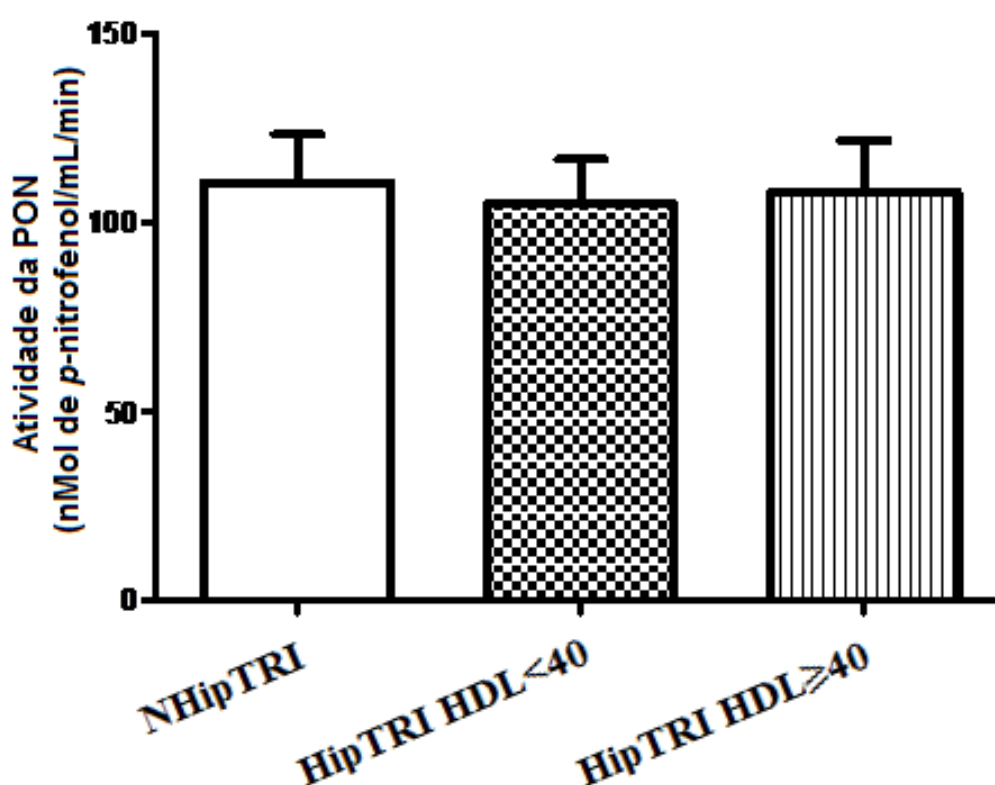


Figura 5 - Atividade da PON nas amostras dos 66 indivíduos, classificados nos três grupos. Não houve diferença significativa pelo teste estatístico One-way ANOVA e pós teste de Tukey-Kramer, ($p=0,9484$). Diferença significativa quando $p < 0,05$, para intervalo de confiança de 95%. NHipTRI: pacientes não-hipertrigliceridêmicos; HipTRI HDL-C < 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL; HipTRI HDL-C \geq 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL

A figura 6 mostra o tamanho da partícula HDL em relação aos grupos estudados. Não houve diferença do tamanho da HDL entre os grupos ($p=0,8451$). Os dados são descritos em nanômetros e por média \pm desvio padrão para: NHipTRI ($9,47 \pm 0,75$), HipTRI HDL-C < 40 mg/dL ($9,64 \pm 1,19$) e HipTRI HDL-C ≥ 40 mg/dL ($9,62 \pm 0,69$).

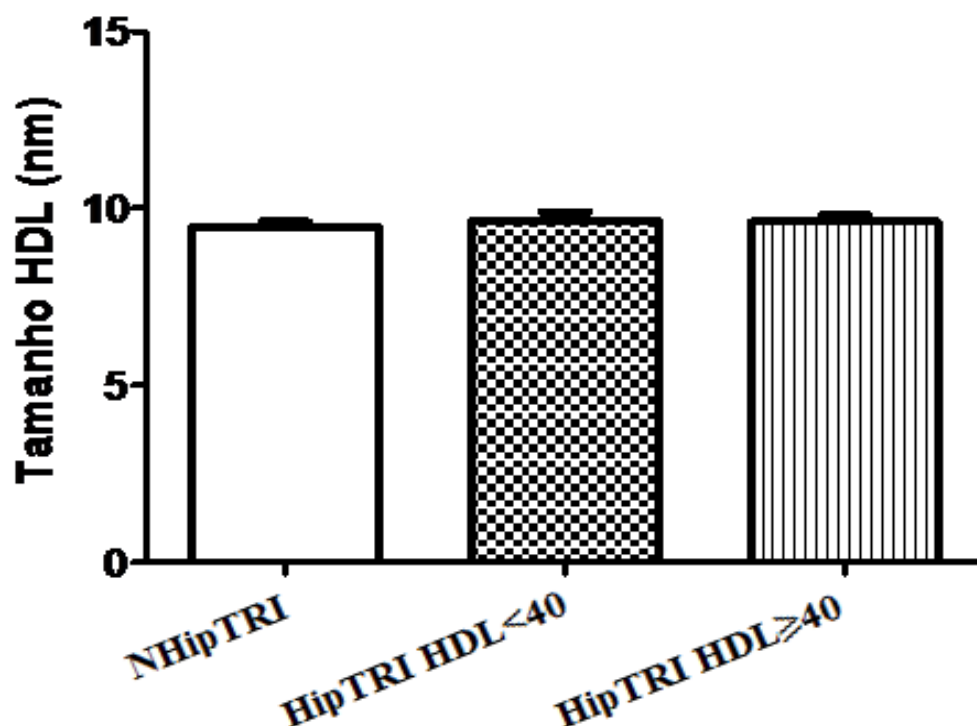


Figura 6 – Tamanho da HDL nas amostras de 59 indivíduos, classificados em três grupos. Não houve diferença significativa em teste estatístico de *Kruskal-Wallis*, pós teste de comparação múltipla de *Dunn*, ($p=0,8451$). Diferença significativa quando $p < 0,05$, para intervalo de confiança de 95%. NHipTRI: pacientes não-hipertrigliceridêmicos; HipTRI HDL-C < 40 : pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL; HipTRI HDL-C ≥ 40 : pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL.

A figura 7 mostra os valores da razão HDL-C / apoA nos três grupos estudados. Os valores deste marcador são maiores no grupo NHipTRI do que nos dois grupos hipertrigliceridêmicos. Os dados são descritos por média \pm desvio padrão para: NHipTRI ($0,29 \pm 0,05$), HipTRI HDL-C < 40 mg/dL ($0,24 \pm 0,05$) e HipTRI HDL-C ≥ 40 mg/dL ($0,25 \pm 0,03$).

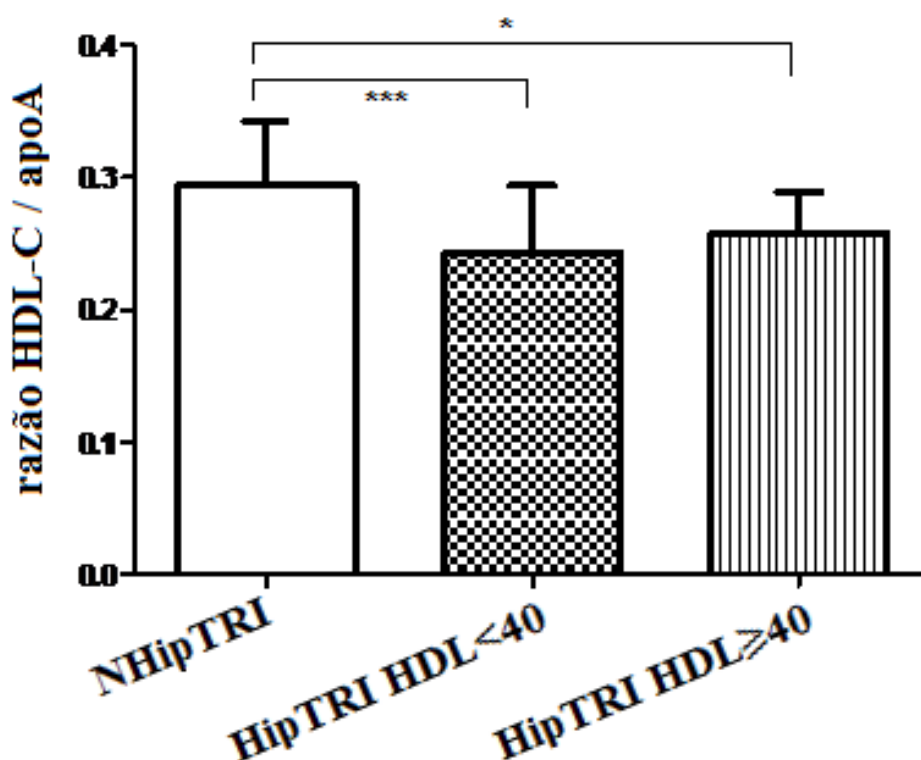


Figura 7 – Razão HDL-C/apoA nas amostras de 63 indivíduos, classificados em três grupos. Houve diferença significativa entre o grupo NHipTRI e os grupos hipertrigliceridêmicos (** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$). Teste estatístico One-way ANOVA com pós Teste de Tukey-Kramer. Foi atribuída diferença significativa entre os grupos quando $p < 0,05$, para intervalo de confiança de 95%. NHipTRI: pacientes não-hipertrigliceridêmicos; HipTRI HDL-C < 40 : pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL; HipTRI HDL-C ≥ 40 : pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL.

O percentual de incorporação de fosfolipídeos na HDL, nos diferentes grupos, é mostrado na figura 8. Não houve diferença de incorporação de PL na HDL entre os grupos ($p=0,3284$). Os dados são descritos por média \pm desvio padrão para: NHipTRI ($43,9 \pm 20,50$), HipTRI HDL-C < 40 mg/dL ($51,6 \pm 8,26$) e HipTRI HDL-C ≥ 40 mg/dL ($48,4 \pm 14,64$).

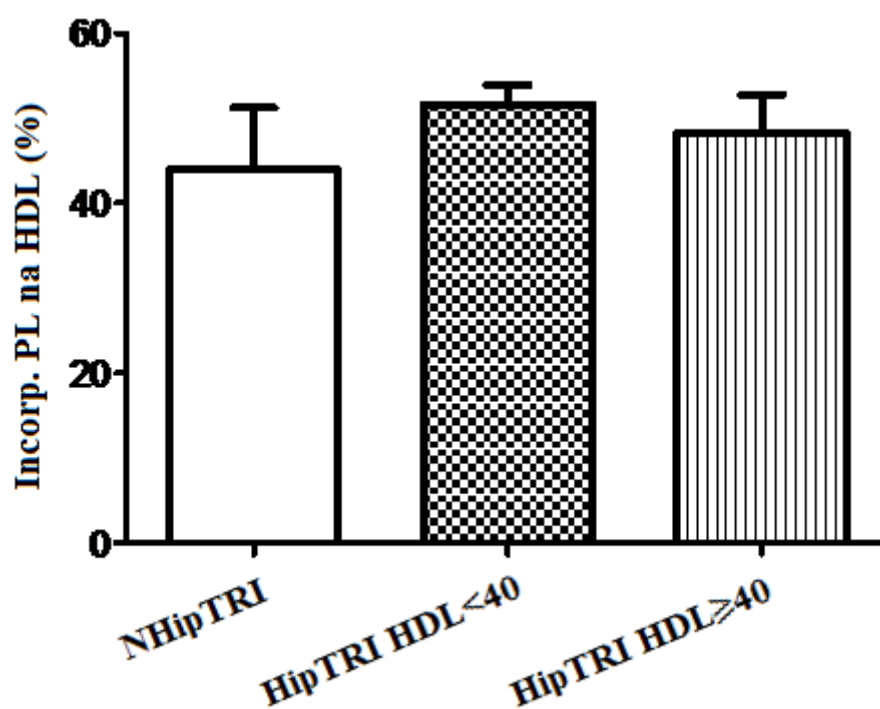


Figura 8 – Incorporação de PL na HDL nas amostras de 37 indivíduos, classificados em três grupos. Não houve diferença significativa. Teste estatístico *Kruskal-Wallis* com pós-teste de comparação múltipla de *Dunn*, ($p=0,3284$). Diferença significativa entre os grupos quando $p < 0,05$, para intervalo de confiança de 95%. NHipTRI: pacientes não-hipertrigliceridêmicos; HipTRI HDL-C < 40 : pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL; HipTRI HDL-C ≥ 40 : pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL.

5.3 Análise de correlação linear

A figura 9 mostra a análise de correlação linear entre a atividade da PON (nMol de p-nitrofenol/mL/min) e a concentração de apoA (mg/dL) nos três grupos estudados. No grupo NHipTRI houve correlação linear positiva (Pearson). Não houve correlação linear nos grupos HipTRI HDL \geq 40 e HipTRI HDL $<$ 40.

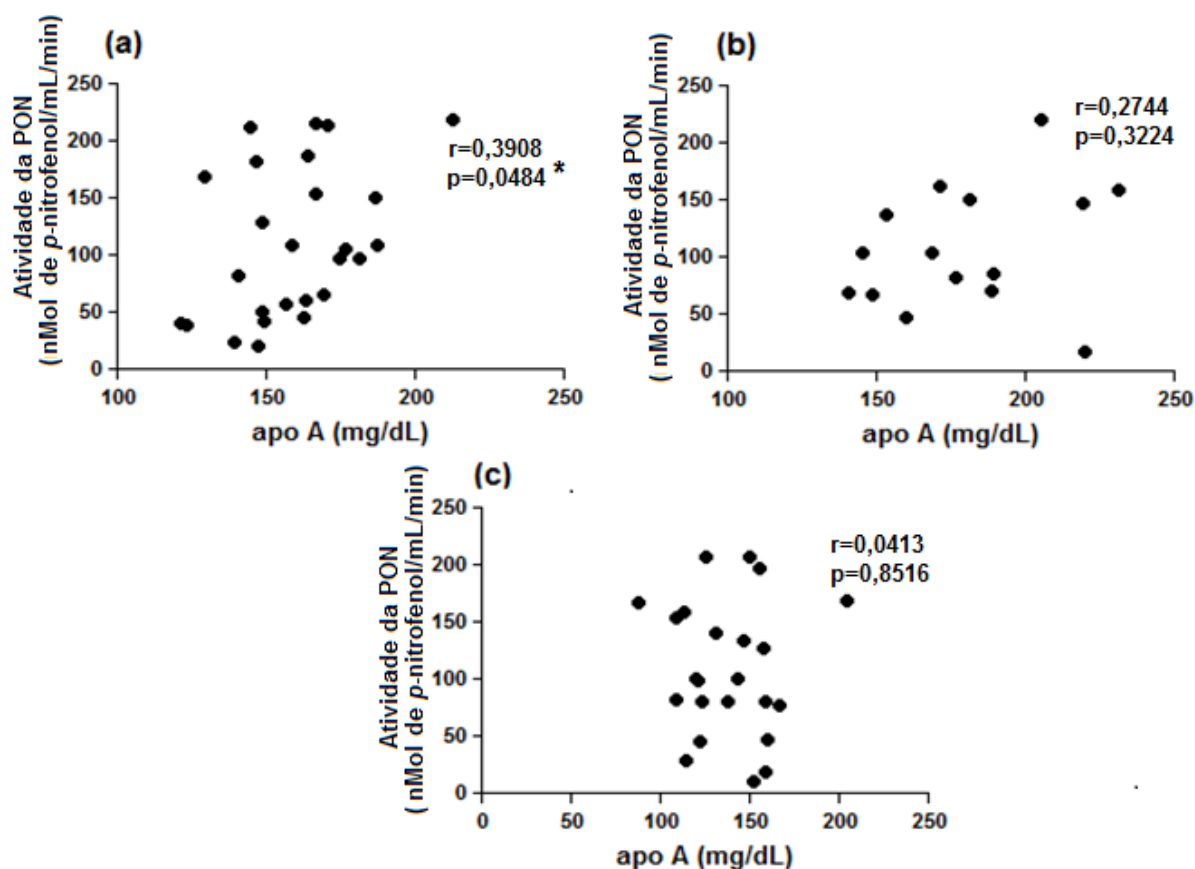


Figura 9 – Análise da correlação linear entre a atividade da PON (nMol de p-nitrofenol/mL/min) e a concentração de apoA (mg/dL). Análise de correlação linear de Pearson para os três grupos. Foi atribuída significância quando $p < 0,05$, para intervalo de confiança de 95%. NHipTRI com correlação linear positiva. **(a)** NHipTRI: pacientes não-hipertrigliceridêmicos; **(b)** HipTRI HDL-C \geq 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL; **(c)** HipTRI HDL-C $<$ 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL.

A figura 10 mostra a análise de correlação linear entre a atividade da PON (nMol de – nitrofenol/mL/min) e a concentração de apoB (mg/dL) nos três grupos estudados. Houve correlação linear positiva no grupo HipTRI HDL \geq 40 (Pearson). Não houve correlação linear nos grupos NHipTRI e HipTRI HDL $<$ 40.

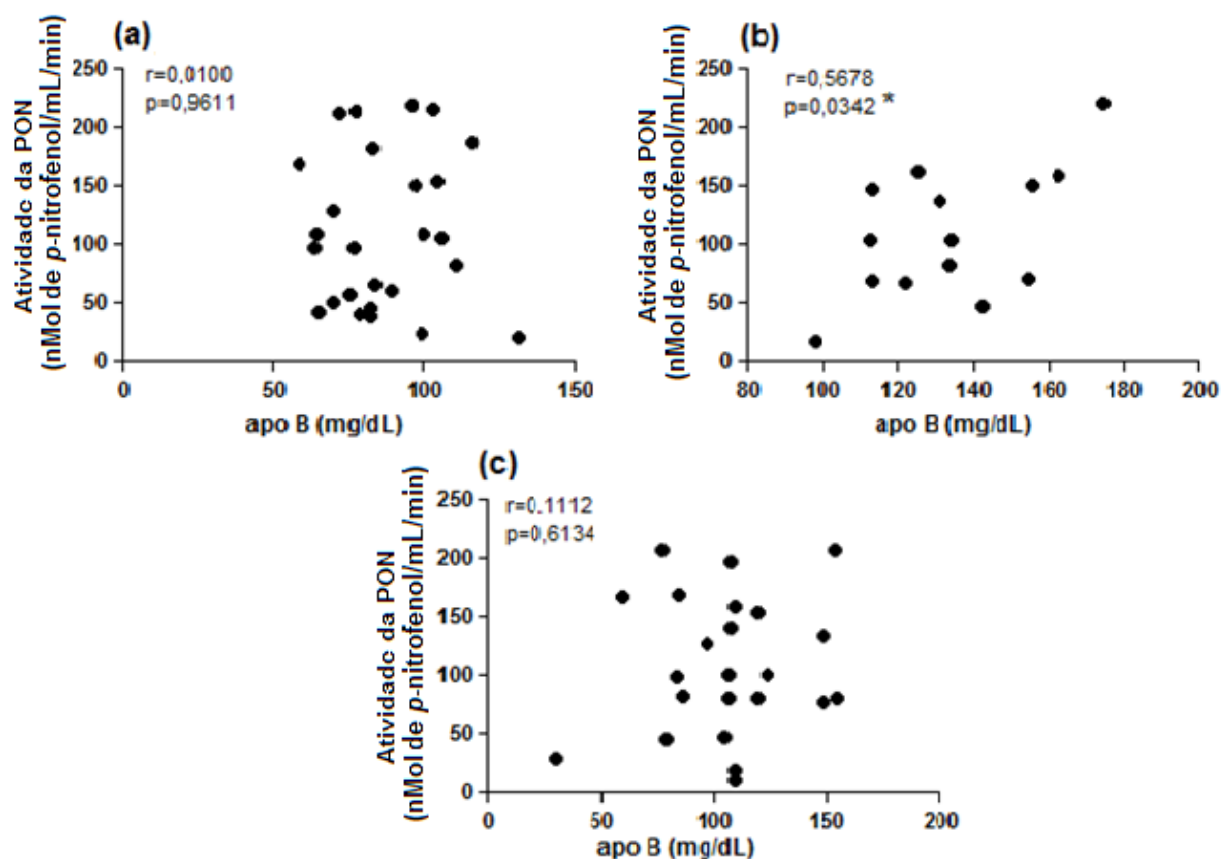


Figura 10 – Análise da correlação linear entre a atividade da PON (nMol de p-nitrofenol/mL/min) e a concentração de apoB (mg/dL). Análise de correlação linear de Pearson para os três grupos. Foi atribuída significância quando $p < 0,05$, para intervalo de confiança de 95%. HipTRI HDL-C \geq 40 com correlação linear positiva. **(a)** NHipTRI: pacientes não-hipertrigliceridêmicos; **(b)** HipTRI HDL-C \geq 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL; **(c)** HipTRI HDL-C $<$ 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL.

A figura 11 mostra a análise de correlação linear entre o percentual de incorporação de PL na HDL (%) e a concentração de apoB (mg/dL) nos três grupos estudados. Houve correlação linear negativa entre a incorporação de PL na HDL e a concentração de apoB no grupo HipTRI HDL < 40 (Pearson). Não houve correlação nos grupos NHipTRI e HipTRI HDL ≥ 40.

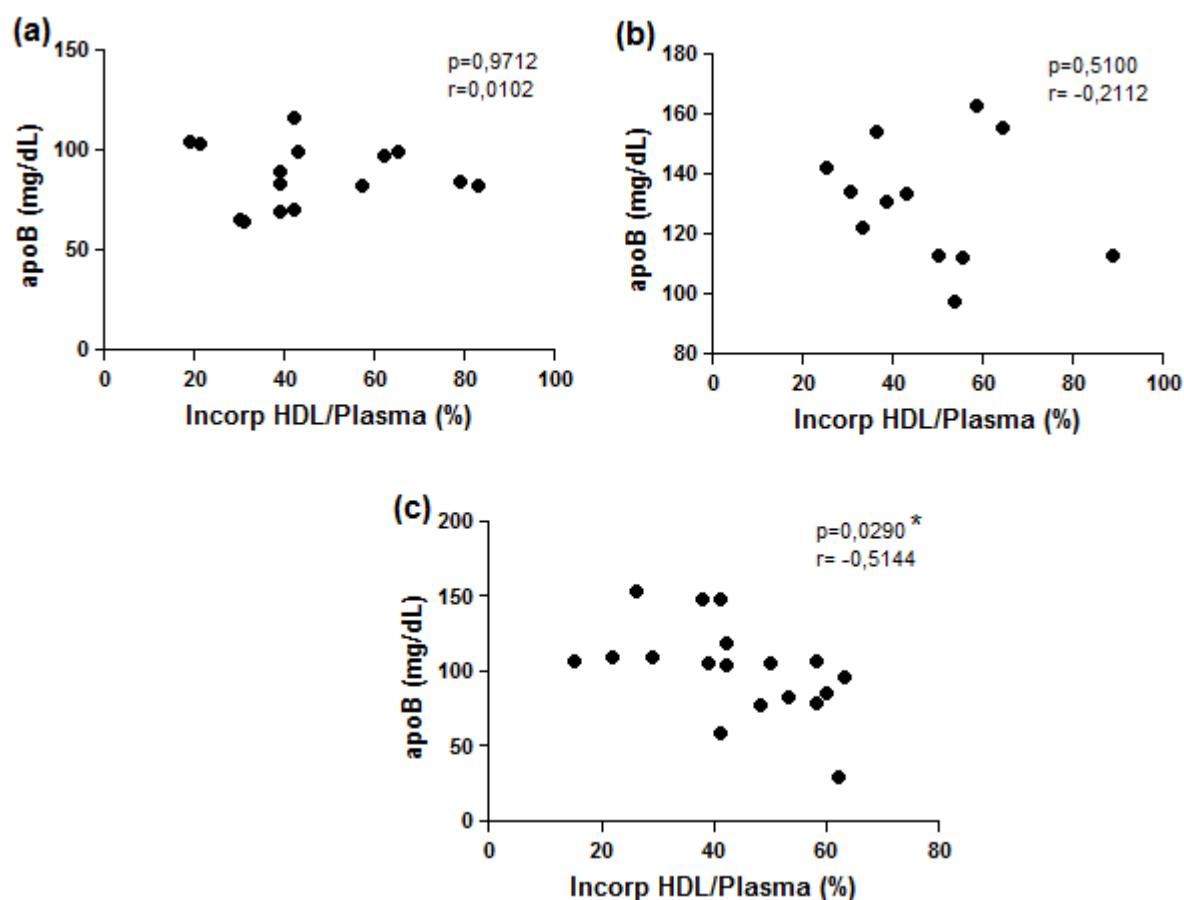


Figura 11 – Análise da correlação linear entre o percentual de incorporação de PL na HDL (%) e a concentração de apoB (mg/dL). Análise de correlação linear de Pearson para os três grupos. Foi atribuída significância quando $p < 0,05$, para intervalo de confiança de 95%. Correlação linear negativa no grupo HipTRI HDL-C < 40. Incorp HDL/Plasma: quantidade de PL-C14 incorporado na HDL a partir do PL-C14 total no plasma. (a) NHipTRI: pacientes não-hipertrigliceridêmicos; (b) HipTRI HDL-C ≥ 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C igual ou acima de 40mg/dL; (c) HipTRI HDL-C < 40: pacientes com hipertrigliceridemia e valores de HDL-C abaixo de 40mg/dL.

6. DISCUSSÃO

A avaliação da casuística desse estudo, composta unicamente por indivíduos do sexo masculino, idade média 51 anos, em relação ao sedentarismo e hipertensão mostrou valores próximos dos dados descritos pela organização mundial de saúde (WHO, 2010) sobre a população brasileira (Figura 4). A prevalência de sedentarismo observada nos pacientes componentes da casuística desse estudo, pacientes usuários do SUS, foi de 58% enquanto os dados da WHO (2010) mostraram 46%, dados relativos à população brasileira em 2008. Em relação à hipertensão e diabetes melitus (DM) as prevalências observadas foram 42%, contra 45% e 20%, contra 9,7%, respectivamente (WHO, 2010). Embora as prevalências de hipertensão sejam semelhantes, no caso da DM, as prevalências mostram distanciamento importante, que poderiam estar atrelados a diferenças no tamanho de amostra entre os estudos. No entanto, o percentual observado aqui (20%) está em acordo com dados do nosso grupo recentemente apresentados no relatório PPSUS 2009/2012 para casuística de 2000 indivíduos em Salvador/Bahia (Prevalência de 18,1%).

Sobre o consumo de álcool, relatam ser etilistas 56%, contra 52% encontrados por Almeida e Coutinho (1993). Porém, ressalta-se que a amostra daquele estudo foi composta de ambos os sexos, com faixa etária de 14 anos até indivíduos acima de 70 anos, mas mesmo quando considerada a faixa etária semelhante a este estudo (30 a 70 anos), mantém-se a semelhança dos resultados com prevalência de 52,2% de etilistas naquele estudo. Segundo revisão de Brinton (2012), uma ingestão moderada de álcool, até 60g ou dois drinks por dia, tem sido associada à diminuição do risco para DCV. Na tabela 1, que estratifica os dados nos grupos não-hipertrigliceridêmicos (NHipTRI); hipertrigliceridêmicos (HipTRI), HipTRI com HDL-C < 40mg/dL (HipTRI HDL-C<40), e HipTRI com HDL-C ≥ 40mg/dL (HipTRI HDL-C≥40), em relação ao consumo regular de

álcool, encontrou-se que 61,5% dos indivíduos do grupo NHipTRI e 60% do grupo HipTRI HDL-C \geq 40 relataram fazer uso moderado de álcool, denominados aqui como etilistas. Já no grupo HipTRI HDL-C $<$ 40 o percentual foi de 42,9%, corroborando dados da literatura, onde o uso moderado de álcool está relacionado a maiores níveis séricos do HDL-C (COSTA et al., 2005; BRINTON, 2012). Pode ser observado que nos indivíduos deste estudo os níveis de HDL-C nos grupos NHipTRI e HipTRI HDL-C \geq 40 foram iguais, 47 ± 10 mg/dL e 47 ± 7 mg/dL, respectivamente. Já no grupo que apresentou menor prevalência de etilistas - HipTRI HDL-C $<$ 40 - o nível foi significativamente menor, 33 ± 4 mg/dL ($p<0,0001$, Mann Whitney).

Em relação ao diabetes observa-se 15,4% de prevalência no grupo Não-HipTRI e 29,4% nos indivíduos que apresentaram hipertrigliceridemia (HipTRI) (tabela 1), dados que falam a favor do aumento no risco para o desenvolvimento da aterosclerose para os HipTRI. O diabetes não controlado e níveis séricos de TG aumentados, frequentemente estão associados à elevada concentração sérica de LDL pequena e densa, partícula com forte atividade aterogênica (BERNEIS and KRAUSS, 2002; KANNEL and VASAN, 2009). As prevalências do diabetes nos dois grupos hipertrigliceridêmicos foram de 18,2% e 34,8%, respectivamente para os grupos HipTRI HDL-C \geq 40 e HipTRI HDL-C $<$ 40, neste último grupo há menor proteção para aterosclerose, visto que pacientes diabéticos não controlados habitualmente também apresentam hipertrigliceridemia associada a HDL-C baixo, conforme mencionado, perfil conhecido de maior risco para aterosclerose (KANNEL and VASAN, 2009).

Já a tabela 2 mostra que em geral as determinações bioquímicas relacionadas com metabolismo lipídico dos indivíduos participantes do estudo, CT, TG, HDL-C, VLDL-C, apoA e apoB apresentaram diferenças entre os grupos NHipTRI, HipTRI HDL-C \geq 40 e HipTRI HDL-C $<$ 40, conforme esperado em função das alterações associadas à hipertrigliceridemia previamente descritas na literatura científica (JACOBSON et al.,

2007; BOULLART et al., 2012). Destaca-se, porém, que a comparação entre os grupos em relação à apoA evidencia maiores valores no grupo HipTRI HDL ≥ 40 (180 ± 29 mg/dL), quando comparado com o grupo HipTRI HDL < 40 (137 ± 26 mg/dL; $p < 0,001$) e com o grupo NHipTRI (159 ± 21 mg/dL; $p < 0,05$) (tabela 2). Analisando os dados de apoA juntamente com os valores de HDL-C nos grupos NHipTRI e HipTRI ≥ 40 (47 ± 10 mg/dL e 47 ± 7 mg/dL, respectivamente), a despeito de apresentarem níveis de HDL-C iguais, o grupo NHipTRI, em relação a ação da HDL, teria perfil de maior proteção contra DCV, em razão de sua população de partículas de HDL provavelmente se apresentar em menor número, mas com diâmetros maiores (JIA et al., 2006).

Das capacidades antiateroscleróticas da HDL, muito pode ser atribuído a ação antioxidante da PON, enzima que age inibindo formação de hidroperóxidos na superfície das LDL, na parede dos vasos sanguíneos (NAVAB et al., 2004). A figura 5 mostra que há similaridade entre as atividades da PON nos grupos estudados. Similaridade que se mantém mesmo após correção da atividade da PON pela concentração da apoA, com o objetivo de anular possível interferência da apoproteína nos resultados, conforme já publicado por Paragh e colaboradores (2003) (dados não mostrados). Segundo Costa e colaboradores (2005) este fato pode ser encontrado em razão de fatores ambientais e polimorfismos, que chegam a causar variação da atividade da PON em até 40 vezes entre indivíduos. Entretanto, houve correlação linear positiva no grupo NHipTRI, e não nos outros grupos, entre as variáveis PON e apoA ($r=0,398$; $p=0,0484$; Pearson) (Figura 9), semelhante ao encontrado por Garin e colaboradores (2006), que relataram significativa correlação entre PON e apoA em indivíduos livres de DCV, sem encontrar a mesma correlação nos portadores da doença. Assim pode-se inferir que nossos pacientes não-hipertrigliceridêmicos se comportam como os indivíduos livres de DCV daquele estudo. Deakin et al. (2002) mostraram também associação entre a atividade da PON e HDL-C, em função da sua apolipoproteína estrutural (apoAI), onde a apoAI

participaria do transporte da enzima do fígado para a circulação. Posteriormente, o estudo de James and Deakin (2010), confirma a relação entre as apoAI e apoAII e a atividade da PON, sugerindo que as apoproteínas exerceriam influência indireta, sequestrando lipídeos oxidados que comprometeriam a atividade da enzima, estando relacionadas com a estabilidade e função da PON, e não apenas ao transporte da enzima.

No grupo HipTRI HDL-C \geq 40, foi observada correlação linear positiva entre apoB e atividade da PON ($r=0,5678$; $p=0,0342$; Pearson) (Figura 10). Garin e colaboradores (2006) relatam correlação positiva entre concentração de LDL-C e atividade da PON, somente em indivíduos com doença vascular, quando comparados com não portadores da doença. Rozek e colaboradores (2005) relatam correlação positiva entre atividade da PON e concentrações de LDL-C e VLDL-C, também em indivíduos portadores de doença vascular carotídea. Nenhum dos dois estudos pesquisou possível correlação entre apoB e atividade da PON, mas como a apoB é a apoproteína exclusiva das LDL e VLDL, talvez o grupo HipTRI HDL-C \geq 40 deste trabalho estejam se comportando como os pacientes portadores de doença vascular daqueles estudos. Além disto, a concentração de LDL-C foi maior neste grupo HipTRI HDL-C \geq 40 do que nos outros grupos estudados. Por outro lado, em indivíduos livres de DCV a atividade da PON, com frequência, mostra correlação positiva com apoA, HDL-C e colesterol total (BIRJMOHUN et al, 2009). Entretanto, diferente da casuística utilizada por outros autores, este estudo segregou os pacientes de acordo com presença ou não de hipertrigliceridemia, sendo assim são necessários novos estudos para verificar quais fatores presentes na hipertrigliceridemia podem estar influenciando os achados.

Não foi observada diferença no tamanho de partícula da HDL entre os grupos estudados (Figura 6), quando determinado diretamente, pelo método de espalhamento de luz, no equipamento ZetaPALMS (*InCor-HCFM/USP*). Porém, outra maneira de se estimar o

tamanho da partícula de HDL é pela razão HDL-C/apo-A (BRINTON, et al., 1994), utilizando esta razão HDL-C/apoA, observa-se diferença significativa entre os grupos (Figura 7). O maior valor da razão HDL-C/apoA foi observado no grupo NHipTRI ($0,29 \pm 0,05$). Nos grupos com hipertrigliceridemia os valores foram: HipTRI HDL-C < 40 mg/dL ($0,24 \pm 0,05$) e HipTRI HDL-C \geq 40 mg/dL ($0,25 \pm 0,03$). Assim, este trabalho encontra consonância com Gou et al. (2005) que encontraram maior frequência de pré- β -HDL (partículas menores) em indivíduos com hipertrigliceridemia e maior frequência de HDL₂ (partículas maiores) nos indivíduos normolipidêmicos, com destaque para o gênero masculino. Outros estudos relatam que as subclasses de HDL apresentam diferentes capacidades para remover colesterol das paredes dos vasos nos tecidos periféricos (FORTI and DIAMENT, 2006; LLERA-MOYA et al., 2010). Partículas de HDL menores estão associadas a risco maior de DAC, enquanto que partículas maiores de HDL contribuem para a redução no risco cardiovascular (JIA et al., 2006). As diferenças observadas entre a medida direta do tamanho de partícula da HDL e a estimativa de tamanho podem estar associadas ao tempo de congelamento e transporte das amostras para a região sudeste (*Incor-HCFMUSP*), em função da instabilidade da HDL em relação às condições supramencionadas (LIMA and MARANHÃO, 2004)

O percentual de incorporação de fosfolípidos na partícula HDL não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,3284$) (Figura 8), conforme valores mostrados na tabela 3, NHipTRI ($43,9 \pm 20,50$), HipTRI HDL-C < 40 mg/dL ($51,6 \pm 8,26$) e HipTRI HDL-C \geq 40 mg/dL ($48,4 \pm 14,64$). A metodologia utilizada, *in house*, baseada nas metodologias de substrato exógeno em uso na literatura (STOKKE and NORURM, 1971; CHANNON et al., 1990), foi desenvolvida para avaliar a incorporação de PL marcados nas partículas HDL, porém, embora traga facilidades operacionais em comparação com metodologias que necessitam de partículas doadoras, como lipoproteínas artificiais, ou uso de ultracentrifugação, traz dificuldades em função da atual impossibilidade de comparar os

dados obtidos com dados de outros estudos. Atualmente estudos avaliam a atividade indireta da PLTP a partir da capacidade de transferência de moléculas marcadas entre lipoproteínas utilizando micelas, lipossomos e lipoproteínas artificiais como doadoras (CHEUNG et al., 2009; PUK et al., 2009; AZEVEDO et al., 2011).

A correlação linear negativa encontrada entre o percentual de incorporação de PL-¹⁴C na HDL e a concentração de apoB no grupo HipTRI HDL<40 ($r=-0,5144$; $p=0,0290$; Pearson) (Figura 11) pode ser justificada em função deste grupo apresentar o menor tamanho estimado das partículas de HDL, o que pode ser indicativo de menor remodelamento das HDL. Conforme já explanado, na hipertrigliceridemia há aumento das concentrações das lipoproteínas contendo apoB e também espera-se redução da concentração de HDL-C e do tamanho das partículas de HDL (XU and FU, 2003, GOU et al., 2005, JIA et al., 2007). Neste grupo, provavelmente, o fato da população de partículas de HDL apresentar tamanho estimado médio menor as caracteriza como HDL menos ativas no remodelamento e, portanto, prováveis menos aceptoras de PL-¹⁴C. Além disso, a quantidade de partículas contendo apoB (VLDL, β -VLDL e LDL) pode estar interferindo por competição na incorporação de PL-¹⁴C na HDL.

6.1. Limitações do estudo

O processo de aquisição das amostras dos indivíduos de maneira aleatória e não direcionada, e da utilização apenas das amostras colhidas para realização de determinações de apoio diagnóstico de rotina dos pacientes, resultou em baixo número de amostras por grupos após a estratificação dos dados, além de pouco volume de amostra para realização dos procedimentos em alguns pacientes participantes do estudo. Com isto alguns ensaios ficaram prejudicados, em particular as determinações da incorporação de PL-¹⁴C e do tamanho das partículas HDL. Para a determinação do

tamanho médio das partículas as amostras foram enviadas para São Paulo (*Incor-HCFMUSP*). Em razão de logística, foi necessário o congelamento de número mínimo razoável para o envio. O congelamento, tempo e condições de transporte podem ter interferido na qualidade do teste realizado. A determinação da incorporação de PL-14C na HDL pode ter apresentado falhas metodológicas, por ser uma técnica *in house*, embora todo o cuidado necessário tenha sido tomado, sugerindo a necessidade de aprimoramentos, sendo também importante considerar o pequeno número amostral para obtenção de conclusões convincentes. Além disso, o estudo apresenta as limitações características de estudos de corte transversal como impossibilidade de testar hipótese, não demonstrar temporalidade entre exposição e doença, além de não permitir determinar incidências limitando-se às prevalências dos agravos.

7. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou semelhança na atividade da PON entre pacientes não-hipertrigliceridêmicos e hipertrigliceridêmicos, mesmo com estratificação por nível de HDL-C, porém os diferentes comportamentos da PON frente a correlações, como por exemplo, com os níveis séricos de apoB, somente observada no grupo hipertrigliceridêmico com HDL-C ≥ 40 , e sua correlação com apoA, observada apenas no grupo não-hipertrigliceridêmico, nos leva a sugerir, neste caso, que a atividade da PON pode ser influenciada por níveis de TG. O tamanho estimado de partícula da HDL foi inversamente relacionado à presença de hipertrigliceridemia, variando também, como esperado, em relação aos níveis séricos de HDL-C, o que confirma a influencia do nível de TG no remodelamento da HDL. Na incorporação de PL-¹⁴C na HDL foi observada tendência ($p=0,0768$) para diferença entre os grupos, o que aponta para possível influência dos níveis de TG também na incorporação de PL-¹⁴C na HDL.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para novos estudos, determinar a atividade e massa da enzima PLTP em paralelo à técnica utilizada para avaliar a capacidade de incorporação de PL, no intuito de avaliar o comportamento entre grupos não-hipertrigliceridêmicos e hipertrigliceridêmicos. Determinar também, as atividades das enzimas LPL e LH, visto que as mesmas estão diretamente envolvidas na catálise dos triglicerídios, e conseqüentemente, interferem conjuntamente no remodelamento da HDL no plasma.

9. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. M.; COUTINHO, E. S. F.. Prevalência de consumo de bebidas alcoólicas e de alcoolismo em uma região metropolitana do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 23-29, 1993.

ASSMANN, G.; SCHULTE, H.; VON ECKARDSTEIN A.; HUANG, Y.. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**, v. 124, s. 11-20, 1996.

AZEVEDO, C.H.M.; WAJNGARTEN, M.; LO PRETE, A.C.; DIAMENT, J.; MARANHÃO, R.C. Simultaneous transfer of cholesterol, triglycerides, and phospholipids to high-density lipoprotein in aging subjects with or without coronary artery disease, **Clinical Science**, v. 66, p. 1543-1548, 2011.

BALLANTYNE, C.M.; HOOGEVEEN, R. C. Role of lipid and lipoprotein profiles in risk assessment and therapy. **American Heart Journal**, v. 146, p. 227-233, 2003.

BARTER, P.; NICHOLLS, S.; RYE K.A.; ANANTHARAMAIAH, G.M.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M. Antiinflammatory Properties of HDL. **Circulation Research**, v. 95, p. 764-772, 2004.

BARTER, P.; KASTELEIN, J.; NUNN, A.; HOBBS, R. High-density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis: the unanswered questions. **Atherosclerosis**, v. 168, p.195-211, 2003.

BERGLUND, L.; BRUNZELL, J.D.; GOLDBERG, A.C.; GOLDBERG, I. J.; SACKS, F.; MURAD, M. H.; STALENHOF, A.F.H. Evaluation and Treatment of Hypertriglyceridemia: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.**, v. 97(9), p. 2969-2989, 2012.

BERNEIS, K.K.; KRAUSS, R.M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. **Journal of Lipid Research**, v. 43, p. 1363–1379, 2002.

BIRJMOHUN, R. S.; VERGEER, M.; STROES, E. S. G.; SANDHU, M. S.; RICHETTS, S. L.; TANCK, M. W.; WAREHAM, N. J.; JUKEMA, J. W.; KASTELEIN, J.J.P.; KHAW, K.T.; BOEKHOLDT, S. M. Both Paraoxonase-1 Genotype and Activity Do Not Predict the Risk of Future Coronary Artery Disease; the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. **PLoS One**, v. 4(8), e.6809, p. 1-10, 2009.

BORÉN, J.; TASKINEN, M.-R; ADIELS, M. Kinetic studies to investigate lipoprotein metabolism. **Journal of Internal Medicine**, v. 271, p. 166-173, 2012.

BOULLART, A.C.I; GRAAF, J.; STALENHOF, A.F. Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1281, p. 867-875, 2012.

BREWER, H.B. Jr. High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular diseases. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 387-391, 2004.

BRINTON, E. A; EISENBERG, S.; BRESLOW, J. L. Human HDL cholesterol levels are determined by apoA-I fractional catabolic rate, which correlates inversely with estimates

of HDL particle size. Effects of gender, hepatic and lipoprotein lipases, triglyceride and insulin levels, and body fat distribution. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 14, p. 707-720, 1994.

BRINTON, E. A. Effects of Ethanol Intake on Lipoproteins. **Current Atherosclerosis Report**, v. 14, p. 108-114, 2012.

CHANNON, K. M.; CLEGG, R. J.; BHATNAGAR, D.; ISHOLA, M.; ARROL, S.; DURRINGTON, P. N. Investigation of lipid transfer in human serum leading to the development of an isotopic method for the determination of endogenous cholesterol esterification and transfer. **Atherosclerosis**, v. 80, p. 217-226, 1990.

CHARLTON-MENYS, V.; LIU, Y.; DURRINGTON, P. N. Semiautomated Method for Determination of Serum Paraoxonase Activity Using Paraoxon as Substrate. **Clinical Chemistry**, v. 52, p. 453-457, 2006.

CHEN, X.; SUN, A.; MANSOOR, A.; ZOU, Y.; GE, J.; LAZAR, J. M.; JIANG, X.C. Plasma PLTP activity is inversely associated with HDL-C levels. **Nutricion & Metabolism**, v. 6, n. 49, 2009.

CHEUNG, M.C.; WOLFBAUER, G.; DEGUCHI, H.; FERNÁNDEZ, J. A.; GRIFFIN, J. H.; ALBERS, J. J. Human plasma phospholipid transfer protein specific activity is correlated with HDL size: implications for lipoprotein physiology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, p. 206-211, 2009.

COSTA, L.G.; VITALONE, A.; COLE, T.B.; FURLONG, C.E. Modulation of paraoxonase (pon1) activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 541-550, 2005.

DATASUS – Indicadores e Dados Básicos 2010. No endereço eletrônico: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2011/c08.def>. [acesso em junho de 2012].

DEAKIN, S.; LEVIEV, I.; GOMARASCHI, M.; CALABRESI, L.; FRANCESCHINI, G.; JAMES, R. W. Enzymatically Active Paraoxonase-1 Is Located at the External Membrane of Producing Cells and Released by a High Affinity, Saturable, Desorption, **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 4301–4308, 2002.

DURRINGTON, P.N.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.I. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 473-480, 2001.

FEITOSA-FILHO, G.S.; SEYDELL, T. M.; FEITOSA, A. C. R.; MARANHÃO, R. C. Transferências lipídicas para HDL em diabéticos tipo 2: associações com microalbuminúria, estatina e insulina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, p. 100-106, 2009.

FOGER, B.; SANTAMARINA-FOJO, S.; SHAMBUREK, R. D.; PARROT, C. L.; TALLEY, G. D.; BREWER, H. B. Jr. Plasma Phospholipid Transfer Protein. Adenovirus-mediated overexpression in mice leads to decreased plasma high density lipoprotein (HDL) and enhanced hepatic uptake of phospholipids and cholesteryl esters from HDL. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 43, p. 27393-27400, 1997.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de Alta Densidade: Aspectos Metabólicos, Clínicos, Epidemiológicos e de Intervenção Terapêutica. Atualização para os Clínicos.. **Arq Bras cardiol.**, v. 87, p. 671-679, 2006.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.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. 499-502, 1972.

GARIN, M.C.B.; MOREN, X.; JAMES R. W.. Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. **Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 515-520, 2006.

GORDON, D.J.; PROBSTFIELD, J.L.; GARRISON, R.J.; NEATON, J. D.; CASTELLI, W. P.; KNOKE, J. D.; JACOBS, D. R. Jr.; BANGDIWALA, S.; TYROLER, H. A. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. **Circulation**, v. 79, p. 8-15, 1989.

GOU, L.; FU, M.; XU, Y.; TIAN, Y.; YAN, B.; YANG, L. Alterations of high-density lipoprotein subclasses in endogenous hypertriglyceridemia. **American Heart Journal**. v. 150, n. 5, p. 1039-1045, 2005.

GUPTA, N.; GILL, K.; SINGH, S. Paraoxonases: Structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. **Indian Journal of Medical Research**, v. 130, p. 361-368, 2009.

JACOBSON, T. A.; MILLER, M.; SCHAEFER, E. J. Hypertriglyceridemia and Cardiovascular Risk Reduction. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. 5, p. 763-777, 2007

JAMES, R.W; DEAKIN, S.P. The Contribution of High Density Lipoprotein Apolipoproteins and Derivatives to Serum Paraoxonase-1 Activity and Function. **Humana Press**, v. 660, p. 173-181, 2010.

JIA, L.; LONG, S.; FU, M.; YAN, B.; TIAN, Y.; XU, Y.; GOU, L. Relationship between total cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol ratio, triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio, and high-density lipoprotein subclasses. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 55, p. 1141-1148, 2006.

KANNEL, W.B.; VASAN, R.S.; Triglycerides as vascular risk factors: New Epidemiologic Insights For Current Opinion in Cardiology. **Current Opinion in Cardiology**, v. 24(4), p. 345-350, 2009.

KHERA, A. V., CUCHEL, M.; LLERA-MOYA, M.; RODRIGUES, A.; BURKE, M. F.; JAFRI, K.; FRENCH, B. C.; PHILLIPS, J. A.; MUCKSAVAGE, M.L.; WILENSKY, R. L.; MOHLER, E. R.; ROTHBLAT, G. H.; RADER, D. J. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 127-135, 2011.

KWITEROVICH, P.O. The Metabolic Pathways of High-Density Lipoprotein, Low-Density Lipoprotein, and Triglycerides: A Current Review. **American Journal of Cardiology**, v. 86, s. 5L-10L, 2000.

LIE, J.; CROM, R.; van GENT, T.; van HAPEREN, R.; SCHEEK, L.; SADEGHI-NIARAKI, F.; van TOL, A. Elevation of plasma phospholipid transfer protein increases the risk of

atherosclerosis despite lower apolipoprotein B-containing lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 45, p. 805-811, 2004.

LIMA, E.S.; COUTO, R.D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 169-178, 2006.

LIMA, E. S.; MARANHÃO, R. C. Rapid, Simple Laser-Light-Scattering Method for HDL Particle Sizing in Whole Plasma. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1086-1088, 2004.

LLERA-MOYA, M.; DRAZUL-SCHRADER, D.; ASZTALOS, B. F.; CUCHEL, M.; RADER, D. J.; ROTHBLAT, G. H. The ability to Promote Efflux Via ABCA1 Determines the Capacity of Serum Specimens With Similar High-Density Lipoprotein Cholesterol to Remove Cholesterol From Macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, p. 796-801, 2010.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M.I. Human Serum paraoxonase. **General Pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 329-336, 1998.

MACKNESS, M.I.; HARTY, D.; BHATNAGAR, D.; WINOCOUR, P. H.; ARROL, S.; ISHOLA, M.; DURRINGTON, P. N. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 86, p. 193-199, 1991.

MARUYAMA, C.; IMAMURA, K.; TERAMOTO, T. Assessment of LDL particle size by Triglyceride/HDL-C ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 10, p.186-191, 2003.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. **World Health Organization**, Geneva, 2011.

MOHAMAD, N.; SRINIVASA, T. R.; BRIAN, J. V. L.; ANANTHARAMAIAH, G. M.; FOGELMAN, A. M. The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 145-149, 2009.

NAPOLI, C.; D'ARMIENTO, F. P.; MANCINI, F. P.; POSTIGLIONE, A.; WITZTUM, F. L.; PALUMBO, G.; PALINSKI, W. Fatty Streak Formation Occurs in Human Fetal Aortas and is Greatly Enhanced by Maternal Hypercholesterolemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2680-2690, 1997.

NAVAB, M.; ANANTHARAMAIAH, G.M.; REDDY, S.T.; Van LENTEN, B. J.; ANSELL, B. J.; FONAROW, G. C.; VAHABZADEH, K.; HANNA, S.; HOUGH, G.; KAMRANPOUR, N.; BERLINER, J. A.; LUSIS, A. J.; FOGELMAN, A. M. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. **Journal of Lipid Research**, v. 45, p. 993-1007, 2004.

NUNES, V. S.; QUINTÃO, E. C. R.; CAZITA, P. M.; HARADA, L. M.; FARIA, E. C.; OLIVEIRA, H. C. F. Plasma lipases and lipid transfer proteins increase phospholipid but not free cholesterol transfer from lipid emulsion to high density lipoproteins. **BMC Biochemistry**, v. 2:1, 2001.

PARAGH, G.; SERES, I.; HARANGI, M. BALOGH, Z.; ILLYÉS, L.; BODA, J.; SZILVÁSSY, Z.; KOVÁCS, P. The effect of micronised fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. **Diabetes & Metabolism**, v. 29, p. 613 – 618, 2003.

PUK, C. G.; BOCCHI, E. A.; LO PRETE, A. C.; FERREIRA, S. M. A.; STOLF, N. A. G.; MARANHÃO, R. C. Transfer of Cholesterol and Other Lipids from a Lipid Nanoemulsion to High-density Lipoprotein in Heart Transplant Patients. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 28, n. 10, p. 1075-1080, 2009.

RADER, D.J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**, v. 451, p. 904-913, 2008.

ROZEK, L. S.; HATSUKAMI, T. S.; RICHTER, J. R.; NAKAYAMA, K.; MCKINSTRY, L. A.; GORTNER, D. A.; BOYKO, E.; SCHELLENBERG, G. D.; FURLONG, C. E.; JARVIK, G. P. The correlation of paraoxonase (PON1) activity with lipid and lipoprotein levels differs vascular disease status. **Jornal of Lipid Research**, v. 46, p. 1888-1895, 2005.

SANTOS, A. P. C.; CASTILHO, M. S.; SANTOS, R.; COUTO, R. D. Proteína de Transferência de Colesterol Esterificado (CETP): potencial dos inibidores de CETP na redução da incidência de doenças cardiovasculares associadas à hipertrigliceridemia e baixos níveis do HDL-C. **Revista de Ciências Médica e Biológicas**, v. 10, n. 2, p. 187-193, 2011.

SENTI, M.; TOMÁS, M.; FITÓ, M.; WEINBRENNER, T.; COVAS, M-I.; SALA, J.; MASIÁ, R.; MARRUGAT, J. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, n.11, p.5422-5426, 2003.

SPOSITO, C.A. (Coord.); CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. et al. IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, s. 1, p. 1-19, 2007.

STOKKE, K. T.; NORURN, K. R. Determination of Lecithin: Cholesterol Acyltransfer in Human Blood Plasma. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 27, p. 21-27, 1971.

TIAN, L.; LONG, S.; FU, M.; LIU, Y.; XU, Y.; JIA, L. Characteristics of High-density Lipoprotein Subclasses Distribution for Subjects with Desirable Total Cholesterol Levels. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 64, p. 1-9, 2011.

World Health Organization (WHO), Geneva, Causes of death 2008. No endereço eletrônico: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/cod_2008_sources_methods.pdf. [acesso em junho de 2012].

World Health Organization (WHO), Global status report on noncommunicable disease 2010. **WHO Library Cataloguing in Publication Data**. No endereço eletrônico: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/ [acesso em 2 de novembro de 2012].

World Health Organization (WHO) in 2011, The 10 leading causes of death by broad income group (2008). No endereço eletrônico: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html. [acesso em junho de 2012].

XU, Y.; FU, M. Alterations of HDL subclasses in hyperlipidemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 332, p. 95-102, 2003.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-ESCLARECIDO

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

1. NOME DO PACIENTE.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : () M Ž () F Ž
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M Ž F Ž
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:.....
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

ATIVIDADE DA PARAOXONASE / ARIL-ESTERASE (PON) E INCORPORAÇÃO DE FOSFOLIPÍDEOS EM PARTÍCULAS DE HDL NA HIPERTRIGLICERIDEMIA HUMANA.

Pesquisador: Prof. Dr. RICARDO DAVID COUTO (Coordenador)
Cargo/Função: Professor adjunto IV do Dep. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, MAT. SIAP. 1490663
Inscrição no Conselho Federal de Farmácia – BA Nº 2884

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

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

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

1. **Justificativa** – Para uma melhor compreensão das doenças cardiovasculares é importante estudar a presença de marcadores de risco cardiovascular que possam ajudar no diagnóstico precoce e propiciar ações preventivas na saúde pública.

2. **Objetivos da pesquisa** – Avaliar a capacidade de incorporação de fosfolipídeos na HDL e atividade antioxidante da PON como marcadores plasmáticos de remodelamento da HDL e transporte reverso do colesterol na presença hipertrigliceridemia.

3. **Protocolo experimental** – Amostras de sangue serão coletadas e posteriormente encaminhadas para o laboratório de pesquisa especializado para a realização do estudo.

ANEXO 1

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

5. Benefícios – A pesquisa visa comprovar riscos para o desenvolvimento da doenças cardiovasculares, melhorando a prevenção através da identificação precoce dos fatores e marcadores de risco.

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

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. **Sim**

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. **Sim**

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. **Sim**

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

Prof. Ricardo David Couto.

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

Farmacêutico – Bioquímico: Marcos Soares Vieira.

Mestrando do CPqGM/Fiocruz

Hospital Naval de Salvador

Pesquisador – Contatos: Tel. xx71-3415-2469, Cel. xx71-9178-1604

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa Salvador,de.....de 2011.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou reponsável legal

ANEXO 2**QUESTIONÁRIO.**

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ - FIOCRUZ
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM BIOQUÍMICA CLÍNICA - UFBA

QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

Paciente n° _____

Nome _____

Comorbidades Associadas

Fatores de risco para doença cardiovascular:

Tabagismo: () Sim () Não

Obs: _____.

Bebida Alcoólica: () Sim () Não

Obs: _____.

Atividade Física: () Sim () Não

Obs: _____.

Hipertensão arterial: () Sim () Não

Obs: _____.

Diabetes: () Sim () Não

Obs: _____.

Hereditariedade: () Sim () Não

Obs: _____.