

**Fernanda Santos Pozzi**

**Cinética plasmática da lipoproteína de baixa densidade e  
avaliação dos aspectos qualitativos da lipoproteína de alta  
densidade em indivíduos com artrite reumatóide**

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

Programa: Cardiologia

Orientadora: Dra Carmen Guilherme  
Christiano de Matos Vinagre

São Paulo  
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pozzi, Fernanda Santos

Cinética plasmática da lipoproteína de baixa densidade e avaliação dos aspectos qualitativos da lipoproteína de alta densidade em indivíduos com artrite reumatóide / Fernanda Santos Pozzi. -- São Paulo, 2011.

**Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.**

Programa de Cardiologia.

Orientadora: Carmen Guilherme Christiano de Matos Vinagre.

Descritores: 1.Artrite reumatóide 2.Aterosclerose 3.Lipídeos 4.Nanoemulsão

USP/FM/DBD-394/11

# DEDICATÓRIA

*Dedico todo este trabalho ao meu irmão Redson que me inspirou em todas as etapas da minha vida. Seus conselhos, suas letras, nossas conversas intermináveis nunca serão em vão!*

*Tenho orgulho de ser sua irmã. Irmã de uma pessoa que teve coragem de protestar por um mundo melhor, de protestar pela paz em todo mundo e por igualdade em uma época de censura e retaliação.*

*Obrigada por colocar a minha “cabeça pra funcionar”!*

*Forte e grande é você!*

***E SEMPRE SERA!***

*“...o mundo dá voltas e a vida se entorta pra gente enxergar,  
o mundo dá voltas e a gente volta pra se reencontrar...”*

# AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais *Alberto* e *Izilda* por todo o amor, dedicação, paciência e conselhos ao longo de toda a minha existência. Nada disso faria sentido se vocês não existissem! Obrigada por todo o amor incondicional! Tudo isso é para vocês!

Ao meu irmão *Pierre* por me fazer sorrir a vida toda! Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar, mesmo que isso signifique eu invadir a sua casa durante alguns meses! Você é minha inspiração de vida...me faz sorrir, pensar e refletir!

Ao meu irmão Júnior por me proporcionar o sentimento de que irmão é para a vida toda! Obrigada por existir!

Ao Giovane Silveira que, ao longo de tantos anos me apoiou, me aconselhou, me consolou em todos os momentos que vivemos juntos. Obrigada por me levar ao cinema há 2 semanas de entregar a tese, por trazer chocolates, por sempre estar disposto, pelo carinho e pelo amor que sempre demonstrou por mim! Você me faz querer ser forte e grande!

À minha orientadora Dra. Carmen, por toda a sua confiança depositada, tanto na área acadêmica, quanto na vida. Obrigada pela amizade, companheirismo e inúmeros momentos de alegria! Mesmos nos momentos mais tensos, fomos capazes de descontrair.

Ao Prof. Raul Maranhão por ter colaborado com o desenvolvimento da minha carreira acadêmica e pela disponibilidade e esforço de ensinar a arte de fazer pesquisa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Borba, a Dra. Lissiane Guedes, a Profa Dra Ieda Laurindo e aos residentes que me auxiliaram na convocação dos pacientes com artrite reumatóide. Sem a ajuda de vocês, esse trabalho não teria se concretizado.

À Aleksandra Tiemi Morikawa, por me receber de braços abertos no laboratório quando eu era apenas uma aluna de iniciação científica e por continuar de braços abertos após 6 anos de convivência! Obrigada por toda amizade e por todas as palavras de apoio! Todas as risadas valeram a pena!

À Débora Fernandes Deus, por me ajudar nas coletas, nos experimentos e por me acompanhar em todos os programas de índio. Obrigada pelo companheirismo e por ser minha amiga-irmã querida!

À Marília Costa Oliveira Sprandel por me ajudar a realizar todos os experimentos, dando certo ou não. Todos os momentos que passamos juntas valeram a pena! Obrigada por todas as risadas!

À Priscila Oliveira por me ajudar em todas as dúvidas, por me emprestar a pipeta automática e facilitar o ensaio das placas de ELISA com 96 pocinhos. Obrigada pela amizade!

À Fátima Freitas por sempre estar disposta a ajudar, tanto na parte científica quanto em conselhos. Meu artigo jamais seria submetido se não fosse você!

À Juliana Vinagre, pelo companheirismo, amizade e pelas inúmeras risadas que demos nos momentos menos apropriados!

À Lisa Ficker, por sempre estar presente e por me ajudar a procurar porque o fosfato entra sozinho em uma das reações da via glicolítica, as onze horas da noite!

Ao Bill Presada, por sempre estar disposto a ajudar nas correções dos artigos em inglês e pela preciosa amizade!

Ao Wanderley por todo o otimismo e positivismo que demonstrou por todo esse tempo. Foi um sucesso!

À Conceição, Augusta e a Maria por sempre estarem dispostas a ajudar.

À todos que de alguma maneira contribuíram para o bem-estar e o término deste trabalho.

***“Doce libertar!”***

*Redson Pozzi*

## NORMALIZAÇÃO

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

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

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

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

# SUMÁRIO

## LISTA DE ABREVIATURAS

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

## RESUMO

## ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Artrite reumatóide.....	1
1.2 Metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL).....	4
1.3 Metabolismo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) .....	7
1.4 Dislipidemia na artrite reumatóide.....	12
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivo específico.....	19
3. CASUÍSTICA.....	20
3.1 Local da pesquisa.....	21
3.2 Recrutamento dos participantes da pesquisa.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Determinações bioquímicas.....	27
4.2 Determinação do diâmetro da partícula de HDL.....	2
4.3 Determinação da concentração plasmática de LDL	



Oxidada.....	29
4.4 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	29
4.5 Preparo da nanoemulsão lipídica artificial semelhante à LDL (LDE).....	30
4.6 Estudos cinéticos com a LDE.....	31
4.6.1 Análise dos dados cinéticos.....	32
4.6.2 Avaliação do risco radiológico relacionado aos estudos cinéticos.....	34
4.7 Avaliação da transferência de lípides da LDE para a HDL..	36
4.8 Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1 Avaliação clínica.....	40
5.2 Avaliação laboratorial.....	42
5.3 Medida do diâmetro da HDL e taxa de transferência de colesterol livre, colesterol éster, fosfolípidos e triglicérides da nanoemulsão para a HDL.....	44
5.4 Decaimento plasmático do colesterol livre e do éster de colesterol radioativos da LDE.....	45
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	57
8. ANEXO.....	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALI	<i>Annuallimit for intake</i>
ALT	Alanina aminotransferase
Apo	Apolipoproteína
AR	Artrite reumatóide
AST	Aspartatoaminotransferase
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
DAS28	Índice da atividade da doença de 28 articulações
HAQ	Questionário de análise de saúde funcional
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
IMC	Índice de massa corpórea
K	Taxa fracional de transferência
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LDE	Nanoemulsão lipídica artificial
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
MIRD	<i>Medical InternalRadiologicalDosimetry</i>
PCR	Proteína C reativa
PEG	Polietilenoglicol
PLTP	Protéina de transferência de fosfolípidos
PON	Paraoxonase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TG	Triglicérides
TRF	Taxa fracional de remoção
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Deformidade das articulações das mãos na artrite reumatóide.....	1
<b>FIGURA 2.</b> Estrutura da lipoproteína de alta densidade (HDL).....	6
<b>FIGURA 3.</b> Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL).....	8
<b>FIGURA 4.</b> Estrutura da nanoemulsão lipídica artificial (LDE).....	10
<b>FIGURA 5.</b> Preparo da nanoemulsão lipídica artificial semelhante à LDL (LDE).....	31
<b>FIGURA 6.</b> Modelo compartimental utilizado para analisar a cinética plasmática do colesterol livre e do éster de colesterol da LDE.....	34
<b>FIGURA 7.</b> Incubação dos lípides radioativos com o plasma.....	36
<b>FIGURA 8.</b> Percentagem de transferência de lípides radioativos da LDE para a HDL.....	37
<b>FIGURA 9.</b> Curva de remoção plasmática do éster de colesterol no grupo artrite reumatóide e grupo controle.....	46
<b>FIGURA 10.</b> Curva de remoção plasmática do colesterol livre no grupo artrite reumatóide e grupo controle.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Características clínicas dos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle.....	40
<b>TABELA 2.</b> Características clínicas e parâmetros inflamatórios relativos à artrite reumatóide dos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle.....	41
<b>TABELA 3.</b> Medicamentos utilizados pelos pacientes (em %) dos grupos artrite reumatóide e seus subgrupos para tratamento da artrite reumatóide e suas comorbidades e indivíduos do grupo controle.....	42
<b>TABELA 4.</b> Concentrações plasmáticas de lípidos, apolipoproteínas e glicose (mg/dL) dos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle.....	43
<b>TABELA 5.</b> Diâmetro da HDL nos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle.....	44
<b>TABELA 6.</b> Transferência de colesterol livre, colesterol éster, fosfolípidos e triglicérides de uma nanoemulsão para a HDL em % da radioatividade total de cada nanoemulsão lipídica nos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle.....	45
<b>TABELA 7.</b> Taxa fracional de remoção (TRF) e taxas de transferência dos lípidos (k) do éster de colesterol (EC- <sup>14</sup> C) da nanoemulsão LDE (em h <sup>-1</sup> ) no grupo artrite reumatóide, subgrupos e controle.....	46
<b>TABELA 8.</b> Taxa fracional de remoção (TFR) e taxas de transferência de lípidos (k) do colesterol livre (CL- <sup>3</sup> H) da nanoemulsão LDE (em h <sup>-1</sup> ) no grupo artrite reumatóide, subgrupos e controle.....	48

Pozzi FS. *Cinética plasmática da lipoproteína de baixa densidade e avaliação dos aspectos qualitativos da lipoproteína de alta densidade em indivíduos com artrite reumatóide* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Artrite reumatóide é uma doença auto-imune que apresenta acentuado quadro inflamatório e proliferação celular o que, provavelmente, determina a alta prevalência de doenças cardiovasculares quando comparados a população mundial. A mortalidade e a morbidade conseqüentes das doenças cardiovasculares estão 2 vezes aumentadas em pacientes com artrite reumatóide e um dos principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose é a dislipidemia. Esse importante fator de risco vem sendo associado à artrite reumatóide e as concentrações plasmáticas de lípidos são constantemente avaliadas, já que se encontra bem estabelecido a relação entre dislipidemia e alta incidência de doença cardiovascular. No entanto, o verdadeiro impacto das alterações lipídicas na artrite reumatóide não é bem conhecido, já que os resultados de perfil lipídico são contraditórios. Alterações nas concentrações plasmáticas de lípidos não necessariamente acompanham distúrbios no metabolismo das lipoproteínas plasmáticas. O objetivo do presente estudo foi avaliar aspectos do metabolismo da LDL e da HDL, em pacientes com artrite reumatóide. Nesse sentido, foi avaliada a cinética plasmática de uma nanoemulsão lipídica artificial com comportamento metabólico semelhante ao da LDL em 30 pacientes com artrite reumatóide divididos em 2 grupos de acordo com a atividade da doença, alta atividade (n=14) e remissão (n=16) e 30 indivíduos controle. A nanoemulsão marcada com éster de colesterol –  $^{14}\text{C}$  (EC- $^{14}\text{C}$ ) e colesterol livre –  $^3\text{H}$  (CL- $^3\text{H}$ ) foi injetada endovenosamente após 12 horas de jejum. As amostras de sangue foram coletadas em tempos pré-determinados (5 min, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas) após a injeção, para determinação das curvas de decaimento plasmático e da taxa fracional de remoção (TFR) dos lípidos marcados, por análise compartimental. As TFR-EC- $^{14}\text{C}$  e TFR-CL- $^3\text{H}$  foram maiores no grupo AR quando comparado ao grupo controle (49%,  $p < 0,05$  e 44%,  $p < 0,05$ , respectivamente), não havendo diferença entre os subgrupos de artrite reumatóide. No grupo artrite reumatóide e em seus subgrupos, as concentrações de HDL-C e apo E foram maiores quando comparados ao grupo controle (33%,  $p < 0,0001$  e 20%,  $p < 0,01$ , respectivamente), enquanto os níveis de apo B foram menores na artrite reumatóide quando comparados ao grupo controle (16%,  $p < 0,05$ ). A transferência de colesterol esterificado radioativo da nanoemulsão para a HDL foi menor na artrite reumatóide, comparando-se com o grupo controle. A transferência dos outros lípidos foi similar nos dois grupos. A HDL dos pacientes com artrite reumatóide foi menor do que a dos controles. Esses resultados podem contribuir com a melhor compreensão de possíveis

mecanismos relacionados a uma maior incidência de doenças cardiovasculares em pacientes com artrite reumatóide.

Descritores: Artrite Reumatóide; Aterosclerose; Lipídeos; Nanoemulsão.

Pozzi FS. *Plasma kinetics of an LDL-like non-protein nanoemulsion and transfer of lipids to High-Density Lipoprotein (HDL) in patients with Rheumatoid Arthritis*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011.

## ABSTRACT

Mortality and morbidity, as a consequence of cardiovascular diseases, is twice as high in patients with rheumatoid arthritis than in the general worldwide population. This autoimmune disease has predominant inflammatory and cell proliferation background probably explains the high prevalence of cardiovascular disease. Dyslipidemias are important risk factors for cardiovascular disease. This study investigated the link between RA and plasma lipids as a predisposition to this high cardiovascular disease incidence. However, the impact of lipids on cardiovascular risk in rheumatoid arthritis is unclear. So much so, that lipid profiles in patients with rheumatoid arthritis in published studies is contradictory. The events of intravascular lipoprotein metabolism do not necessarily produce altered levels of plasma lipids. In an attempt to unravel novel dysfunctional mechanisms that could trigger pro-atherogenic processes beyond the concentration of the plasma lipids, plasma clearance of a lipidic nanoemulsion that resembles the LDL metabolic behavior were investigated in rheumatoid arthritis patients and compared to control subjects without the disease. 30 patients with rheumatoid arthritis divided into 2 groups according to disease activity, high activity (n=14) and remission (n=16), and 30 controls were studied. A nanoemulsion labeled with  $^{14}\text{C}$ -cholesteryl ester ( $^{14}\text{C}$ -CE) and  $^3\text{H}$ -free cholesterol ( $^3\text{H}$ -FC) were endovenously injected after which blood samples were collected at pre-determined periods (5 min, 1, 2, 4, 6, 8 and 24 hours), in order to determine the radioactivity of the plasma decay curves and calculate the fractional clearance rate (FCR) of the labeled lipids for compartmental analysis. In the rheumatoid arthritis group and subgroups the HDL-C and apo E concentration were higher when compared to control group (33%,  $p < 0,0001$  e 20%,  $p < 0,01$ , respectively) while apo B concentration was lower (16%,  $p < 0,05$ ). The  $^{14}\text{C}$ -CE-FCR and  $^3\text{H}$ -FC-FCR were greater in rheumatoid arthritis group and subgroups when compared to controls (49%,  $p < 0,05$  e 44%,  $p < 0,05$ , respectively). There were no differences between the rheumatoid arthritis subgroups. Therefore,



rheumatoid arthritis accelerates the LDL plasma removal, as indicated by a higher <sup>14</sup>C-CE-FCR and <sup>3</sup>H-FC-FCR. The transfer of other lipids was also similar in both groups. The HDL of the rheumatoid arthritis patients was lower than that of the control group. These results could clarify possible mechanisms that can be related to a higher cardiovascular incidence in patients with rheumatoid arthritis.

.

Descriptors: Rheumatoid Arthritis; Atherosclerosis; Lipids; Nanoemulsion.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Artrite reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é a doença inflamatória crônica, autoimune, mais comum entre as artrites. É caracterizada primariamente por inflamação da membrana sinovial devido à secreção de fatores que promovem o processo inflamatório e à neovascularização, levando à progressiva deformidade e à destruição simétrica irreversível das grandes e pequenas articulações por erosão do osso e cartilagem, acometendo principalmente mãos (Figura 1) e pés (FLEMING *et al*, 1976).



**FIGURA 1.** Deformidade das articulações das mãos na artrite reumatóide

A evolução clínica da maioria dos pacientes é oscilante, intercalando períodos de melhora e de agravamento dos sintomas incluindo rigidez matinal, fadiga e perda de peso. Com a progressão da doença, há incapacidade de realização de atividades cotidianas e profissionais (MOTA *et al*, 2010), acarretando impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade (MONTEIRO *et al*, 2008), tanto em perda de produção como em custo de tratamento.

A AR afeta 0,5 a 1% da população adulta mundial (WEINBLATT *et al*, 2007; SYMMONS *et al*, 2002) e, similarmente, 1% da população brasileira (BRENOL *et al*, 2007), sendo mais frequente em mulheres do que em homens (3:1). Estudos epidemiológicos mostram que a mortalidade e a morbidade nesses pacientes estão aumentadas e a expectativa de vida pode estar diminuída de cinco a quinze anos (WEINBLATT *et al*, 2007).

A estimativa do número de pessoas acometidas por AR e do impacto social que esta doença pode causar está projetada em um aumento de 40% nos Estados Unidos (HOOTMAN *et al*, 2006).

Não há uma clara definição sobre a etiologia da AR, porém há fortes evidências de que a autoimunidade tenha um importante papel em sua cronicidade e progressão.

Apesar do aumento da mortalidade ser associado à severidade da doença, à incapacidade funcional e às manifestações extra-articulares, alguns estudos tem mostrado que pacientes com AR têm maior risco de sofrer infarto do miocárdio e que esse risco triplica em pacientes com dez anos ou mais de doença. (SOLOMON *et al*, 2003; WOLFE *et al*, 2003).

Os pacientes com AR apresentam maior prevalência de hipertensão diastólica, angina e risco aumentado de doença vascular sub-clínica caracterizada pela prevalência de doença arterial periférica e por anormalidades eletrográficas (MCENTERGART *et al*, 2001; ALKAABI *et al*, 2003). Dessa maneira, cerca de metade das mortes na AR é causada por doença cardiovascular (SZEKANECZ *et al*, 2007; PINCUS *et al*, 1986) e provavelmente isso ocorre devido ao processo inflamatório (STEVENS *et al*, 2005) e ao aumento da prevalência dos fatores de risco cardiovasculares (SOLOMON *et al*, 2008; VAN HALM *et al*, 2009; PETERS *et al*, 2008; TOMS *et al*, 2010) que levam ao desenvolvimento acelerado da aterosclerose (KEREKES *et al*, 2008; BACON *et al*, 2001).

O processo inflamatório pode, por si só, ser um fator de risco cardiovascular independente para os pacientes com AR (MARADIT-KREMERS *et al*, 2005; MYASOEDOVA *et al*, 2011). Já se encontra estabelecido que a inflamação sistêmica crônica acelera a aterosclerose, pois níveis elevados de citocinas e quimioquinas pró-inflamatórias estimulam a expressão específica de receptores de membrana que lesam as células endoteliais (DORIA *et al*, 2005), o que contribui com a formação da placa aterosclerótica, favorecendo assim, sua instabilidade e ruptura (LIBBY *et al*, 2002).

O aparecimento ou estabilização do aumento do índice de massa corpórea e da razão cintura/quadril (PINCUS *et al*, 1986; DESSEIN *et al*, 2005; GOODSON *et al*, 2006), sedentarismo, tabagismo, diabetes *mellitus* e hipertensão arterial são tradicionais fatores de risco para eventos

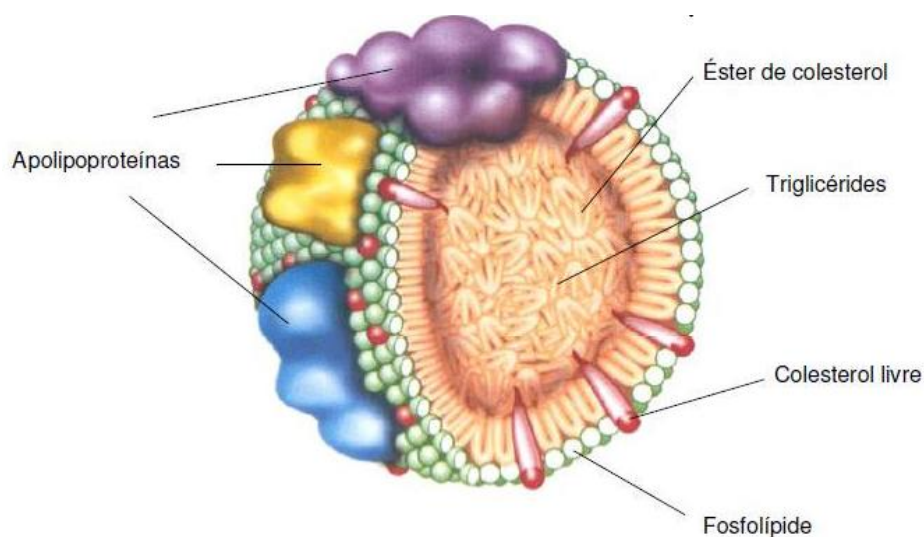
cardiovasculares nesses pacientes. Além destes, a dislipidemia (PANOULAS *et al*, 2008), caracterizada pela diminuição plasmática do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C), aumento de triglicérides (TG) e aumento dos níveis da lipoproteína de baixa densidade (LDL) pequena e densa, tem sido frequentemente citada como um importante fator que contribui para este processo, já que este perfil é considerado pró-aterogênico (RIZZO *et al*, 2009).

## **1.2 Metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL)**

A HDL é uma lipoproteína que desempenha importante papel no transporte endógeno de lípidos plasmáticos. Cerca de 40 a 60% da HDL é constituída de lípidos, sendo 26-32% de fosfolípidos, 15-20% de ésteres de colesterol, 3-5% de colesterol livre e 2-7% de TG (GOTTO *et al*, 1983) e o restante (aproximadamente, 45-55%) constituída por apolipoproteínas (apo). A principal e mais abundante proteína presente na HDL é a apo A-I e, em menor quantidade, a apo A-II. Além da presença de lípidos e proteínas em sua constituição, há também a presença de enzimas com a paraoxonase-1 (PON-1) que possui papel antioxidante e a lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), responsável esterificação do colesterol.

Esta lipoproteína (Figura 2) corresponde a um grupo heterogêneo de partículas e apresenta uma meia-vida de 5 a 6 dias, a mais longa de todas

as lipoproteínas. A HDL é sintetizada principalmente no fígado, inicialmente em forma discóide, com alto conteúdo de colesterol livre e também composta de fosfolípidos e apolipoproteínas, principalmente apo A-I e apo E (EISENBERG, 1984). Essas partículas captam o excesso de colesterol livre das células dos tecidos periféricos e da superfície das lipoproteínas ricas em TG, sendo convertidas a partículas menores as HDL<sub>3</sub>. A apo A-I presente na lipoproteína é um cofator de ativação da LCAT, a qual esterifica o colesterol livre da HDL<sub>3</sub>, convertendo-a a HDL<sub>2</sub>. O éster de colesterol pode ser transferido, através da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), das HDL<sub>2</sub> para as lipoproteínas ricas em TG e para as LDL (GLOMSET, 1973). As lipoproteínas ricas em TG, por sua vez transferem TG para as HDL<sub>2</sub>. A interação da HDL<sub>3</sub> com as células da parede arterial nesse processo de retirada do colesterol livre é mediada por um receptor específico, de superfície celular, com especificidade para a apo A-I. A HDL rica em éster de colesterol é captada pelo fígado através de receptores celulares específicos que reconhecem a apo E (receptores B/E). A HDL também desempenha a importante função de doar apolipoproteínas para as lipoproteínas ricas em TG, necessárias ao metabolismo das mesmas. Além da importante função no transporte reverso do colesterol, a HDL está envolvida com a proteção da função endotelial e mecanismos de proteção contra processos trombóticos, fibróticos, inflamatórios e oxidativos.



**FIGURA 2.** Estrutura da lipoproteína de alta densidade (HDL)

O tamanho da HDL tem sido discutido por alguns autores por apresentar importante papel no transporte reverso do colesterol (AUSTIN *et al*, 1998; ASSMANN *et al*, 1998). Muitos estudos prospectivos demonstraram que a HDL pequena – enriquecida de TG – está associada a doenças cardiovasculares. Isso se deve ao fato de que esta HDL sofre maior ação da lipase hepática e da CETP (RYE *et al*, 1999) tendo sua maturação impedida, dificultando o transporte reverso do colesterol (TIAN *et al*, 2011).

A PON-1 tem a capacidade de prevenir a formação de produtos de oxidação lipídica que resultam na indução de moléculas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL) 8 (VAN LENTEN *et al*, 1995). A parte protéica da HDL, constituída principalmente pela apo A-1 reduz os efeitos pró-inflamatórios dos lipídeos oxidados (NAVAB *et al*, 2000). Algumas subclasses da HDL podem proteger a LDL contra a oxidação. Além disso, a HDL diminui a expressão da molécula de adesão celular vascular (VCAM) 1, molécula de adesão intercelular (ICAM) 1 (RYE *et al*, 2009) e proteína



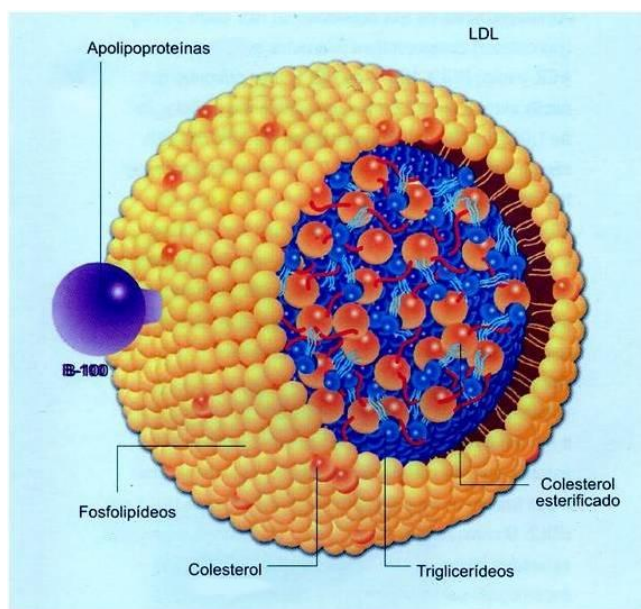
quimiotática do monócito (MCP) 1 (NAVAB *et al*, 1991), atenuando a resposta inflamatória.

### **1.3 Metabolismo da lipoproteína de baixa densidade (LDL)**

A LDL é o principal transportador de colesterol no plasma humano. Cerca de 70% do colesterol plasmático é transportado por essa lipoproteína para o fígado e para vários tecidos periféricos, onde será utilizado em diversos processos metabólicos, como síntese de hormônios e membrana.

A LDL (Figura 3) é o produto final de degradação da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), a lipoproteína rica em triglicérides produzida pelo fígado. A LDL é uma partícula esférica e, assim como todas as lipoproteínas, sua estrutura é determinada de acordo com a polaridade do lipídeo que a constitui. Uma pequena parte de triglicérides e cerca de 45-55% de colesterol esterificado estão no centro da partícula por terem características apolares, já o colesterol livre e o fosfolípide estão na superfície da lipoproteína. Todos esses lipídeos são mantidos nesta estrutura pela apo B-100 que também possui função de ligar a LDL a receptores específicos presentes na superfície da membrana celular. Após essa interação entre apo e receptor, a LDL é internalizada e degradada em vesículas que se fundem aos lisossomas e é esta interação que

representa o principal fator que determina os níveis plasmáticos dessa lipoproteína (GOLDSTEIN *et al*, 1979).



**FIGURA 3.** Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL)

Já se encontra bem estabelecida a relação da LDL com doenças ateroscleróticas e os mecanismos pelos quais essa lipoproteína participa do processo aterogênico (STAMLER *et al*, 1988; PYORALA *et al*, 1994). Defeitos no receptor ou na apo B-100 dificultam a captação celular da LDL, resultando em remoção plasmática deficiente da mesma e conseqüentemente, aumento da concentração plasmática de colesterol de LDL (LDL-C). Isso pode levar a um maior tempo de permanência da LDL no espaço subendotelial, o que pode aumentar a possibilidade da mesma sofrer modificações na sua composição lipídica ou protéica.

Uma vez modificada, principalmente oxidada, a LDL desempenha papel fundamental em todos os estágios da aterogênese incluindo ativação

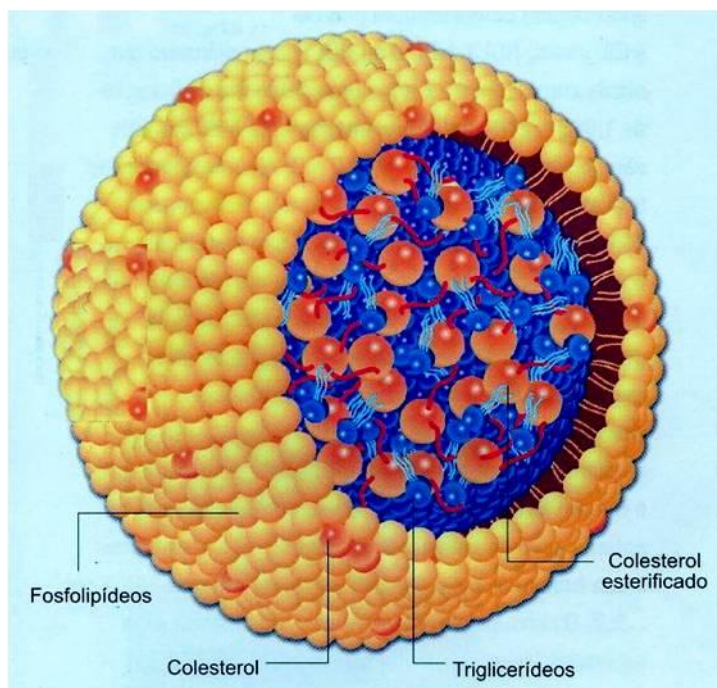
de monócitos, migração de células para o espaço subendotelial, pois passa a não ser reconhecida pelos receptores específicos, sendo removida da circulação sanguínea através de receptores de varredura ou receptores *scavenger*, presentes em células do endotélio, como os macrófagos. Essas células tornam-se repletas de colesterol, convertendo-se em células espumosas, cujo aparecimento é um dos eventos mais precoces no processo aterogênico (STEINBERG *et al*, 1989; STEINBERG, 1993). Além disso, a LDL oxidada ocasiona disfunção endotelial, proliferação e reorganização da matriz extracelular além de estimular o endotélio à produção e liberação de quimiotáticos e moléculas de adesão para leucócitos na superfície endotelial. Todos esses processos colaboram para o desenvolvimento da aterosclerose, sendo um importante marcador para doença arterial coronária.

Além de oxidada, a LDL pode também ter seu tamanho alterado, tornando-se pequena e densa. Muitos estudos demonstraram que a predominância de uma LDL pequena e densa está associada ao aumento do risco cardiovascular devido aos mesmos mecanismos que a LDL oxidada ativa: diminuição da afinidade pelo seu receptor específico, aumento da captação por receptores localizados nas células endoteliais (devido ao seu menor diâmetro) e aumento da suscetibilidade a oxidação (KAMIGAKI *et al*, 2001).

A avaliação do metabolismo da LDL é realizada rotineiramente através da determinação da concentração de colesterol e de apo B. No entanto, simples determinações plasmáticas podem não refletir disfunção no

metabolismo da lipoproteína. Dessa maneira, estudos que pudessem avaliar a remoção plasmática da LDL no homem seriam muito úteis para compreender a fisiopatologia do metabolismo dos lípidos e da aterosclerose. No entanto, esses estudos têm sido muito restritos, devido às dificuldades do isolamento e marcação radiativa da LDL nativa e a necessidade obrigatória do uso da lipoproteína autóloga, devido ao risco de transmissão do vírus da hepatite e da síndrome da imunodeficiência humana adquirida aos indivíduos em que a LDL marcada é injetada para avaliação da remoção do compartimento plasmático.

O desenvolvimento de uma nanoemulsão com composição lipídica parecida com a da LDL natural (LDE), mas sem a parte protéica da lipoproteína, possibilitou reproduzir o metabolismo da LDL (MARANHÃO *et al*, 1993). A LDE não possui proteína (Figura 4), porém nossos estudos demonstraram que ao ser injetada na circulação plasmática, ao entrar em contato com as lipoproteínas naturais, adquire apo E, podendo ser reconhecida pelo receptor da LDL (MARANHÃO *et al*, 1993).



**FIGURA 4.** Estrutura da nanoemulsão lipídica artificial (LDE)

Na hipercolesterolemia familiar, os receptores B/E são deficientes e não captam de maneira eficiente a LDL da circulação sanguínea. Nesta situação, a LDE, ao ser injetada, foi removida muito lentamente da circulação, assim como esperado e mostrando que a nanoemulsão é um potente instrumento para investigação das dislipidemias (MARANHÃO *et al*, 1997).

As facilidades operacionais oferecidas pelo sistema LDE permitem a avaliação em um grupo de vários indivíduos com a mesma preparação. Além disso, a LDE é removida do plasma mais rapidamente do que a LDL natural, devido a maior afinidade dos receptores pela apo E. Desta maneira, o tempo de realização do estudo cinético fica reduzido para 12 ou 24 horas, ao contrário da lipoproteína nativa que exige 2 a 3 dias de acompanhamento.

#### 1.4 Dislipidemia na artrite reumatóide

Já se encontra estabelecido que o aumento dos níveis de colesterol, LDL-C, diminuição do HDL-C e modificações nas estruturas dessas lipoproteínas estão associados ao aumento da incidência de doença cardiovascular na população em geral, porém os dados da literatura em pacientes com AR são contraditórios (HELDENBERG *et al*, 1983; LORBER *et al*, 1985; LAKATOS *et al*, 1988; KAVANAUGH, 1994; ASANUMA *et al*, 1999).

Vários estudos tem demonstrado perfil pró-aterogênico em pacientes com AR (RIZZO *et al*, 2009; GEORGIADIS *et al*, 2006; WHITE *et al*, 2006; CHOI *et al*, 2005). Há uma grande variabilidade nas concentrações plasmáticas de colesterol e do LDL-C na AR, ambos podem estar diminuídos ou normais. O HDL-C encontra-se diminuído, enquanto as concentrações plasmáticas de TG, LDL-oxidada (VUILLEUMIER *et al*, 2010), anticorpos anti-LDL-oxidada e HDL pró-inflamatória estão aumentadas (PARK *et al*, 2002; YOO, 2004; GEORGIADIS *et al*, 2006; MCMAHON *et al*, 2006; DEL RINCÓN *et al*, 2001; ROMAN *et al*, 2006; ROMAN *et al*, 2007; DURSUNOGLU *et al*, 2005).

Em contrapartida, Rossner *et al* (1977) encontraram níveis normais ou até diminuídos de colesterol e de TG em pacientes com AR (RANTAPAA-DAHLQVIST *et al*, 1991) precoce e com alto grau de inflamação (ROSSNER *et al*, 1977).

Há correlação inversa entre a severidade da doença e os níveis plasmáticos de lípides. As concentrações de colesterol e HDL-C diminuem com o início da fase aguda (MARIK, 2006) e, acompanhando a diminuição da atividade da doença após tratamento, ocorre aumento ou normalização sérica desses lípides.

A redução do colesterol e do LDL-C acompanhados pela redução da apo B estão geralmente associados ao aumento dos marcadores inflamatórios (KHOVIDHUNKIT *et al*, 2004) que causam a ativação do sistema mononuclear fagocitário, aumentando o clearance da LDL (SLATER *et al*, 1982).

De acordo com diversos autores (VUILLEUMIR *et al* 2010; KIM *et al*, 2004), os níveis de LDL oxidada não estão apenas aumentados na AR como também se correlacionam com a atividade da doença independentemente de outros marcadores inflamatórios. Assim, a LDL oxidada não desempenharia papel apenas no desenvolvimento da aterosclerose, mas também na AR, já que apresenta importantes propriedades inflamatórias (VUILLEUMIER *et al*, 2010), interferindo no clearance das células apoptóticas nas lesões ateroscleróticas (KHAN *et al*, 2003) e nas articulações acometidas (DAI *et al*, 2000).

Além disso, os pacientes com AR possuem maior concentração de LDL pequena e densa (AUSTIN, 2009; RIZZO *et al*, 2009), que é mais suscetível a processos oxidativos, fator que contribui para o aumento dos níveis plasmáticos da LDL oxidada.

Alguns estudos mostram ainda que a dislipidemia na AR é dependente da atividade da doença, ou seja, quanto maior a atividade, menor as concentrações plasmáticas de colesterol e, principalmente, do HDL-C (BOERS *et al*, 2003; SVENSON *et al*, 1987). Há evidências de que essas alterações lipídicas já estejam presentes em estados iniciais da AR. Além disso, esses pacientes apresentam aumento dos níveis de lipoproteína(a) (Lp(a)) e, frequentemente, maior razão HDL-C/colesterol (STAMPFER *et al*, 1991), sugerindo uma diminuição no HDL-C (PARK *et al*, 1999). A dislipidemia parece ser consequência da liberação sistêmica de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 e IL-6 levando a um estado pró-aterogênico com a presença de resistência à insulina, ativação de células endoteliais e hipercoagulação (NURMOHAMED *et al*, 2009).

Ainda como fatores de risco para doenças cardiovasculares, pacientes com AR apresentam maior estresse oxidativo, disfunção vascular, possível hipertensão arterial e níveis elevados de fatores trombogênicos e inflamatórios (SATTAR *et al*, 2003). Dentre os fatores inflamatórios, a proteína C reativa (PCR) é um importante preditor de risco independente para infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte, pois se encontra elevada na angina instável e está envolvida com o início e progressão da lesão aterosclerótica, pois provoca ativação do sistema complemento e ativação das células endoteliais a expressarem moléculas de adesão e, conseqüentemente, maior liberação de MCP-1 e secreção de endotelina-1 (ET-1) e IL-6, mediando a captação da LDL por macrófagos e



estimulando a produção do fator tecidual dos monócitos, levando assim, a um estado pró-inflamatório, aumentando a mortalidade por doença cardiovascular (ABOU-RAYA *et al*, 2006; KAGEYAMA *et al*, 2006) em duas vezes (PEARSON *et al*, 2003).

Assim como a PCR, níveis elevados de homocisteína têm sido associados à aterosclerose e, conseqüentemente, a doença arterial coronária (DIAS *et al*, 2001; MAYER *et al*, 1996) na AR, já que esse aminoácido tem sido encontrado nas articulações desses pacientes em altas concentrações, o que pode levar ao aumento na produção de citocinas inflamatórias, como a IL-1, acelerando a aterosclerose (LAZZERINI *et al*, 2006). Ainda, a homocisteína pode se correlacionar com a aterogênese através da relação direta com a citotoxicidade, disfunção endotelial, inibição do óxido nítrico, aumento da adesividade plaquetária, ativação de fatores de coagulação e oxidação de lipoproteínas (DIAS *et al*, 2001; WELCH *et al*, 1998; ROBINSON *et al*, 1998; GUBA *et al*, 1996).

Nesta fase aguda da resposta inflamatória, vários estudos têm demonstrado que a HDL pode-se tornar uma lipoproteína pró-inflamatória, favorecendo a aterogênese, já que a inflamação apresenta níveis elevados de IL-1, IL-6 e TNF que podem inibir a ação da lipase lipoprotéica (GRUNFELD *et al*, 1992), uma enzima presente na parede endotelial responsável por hidrolisar os TG das lipoproteínas na corrente sanguínea. Com o enriquecimento de TG, principalmente, dos quilomícrons (lipoproteína responsável pelo transporte de lípidos no estado pós-prandial) e VLDL, há uma maior transferência deste lipídeo entre essas lipoproteínas e a HDL,

favorecendo a substituição do éster de colesterol por TG na HDL em cerca de 50% (PRUZANSKI *et al*, 2000). Além disso, esta situação pode ser agravada pelo possível aumento da atividade da CETP, mediando uma troca mais rápida de TG (GEORGIADIS *et al*, 2006; CABANA *et al*, 1996). Sendo assim, esta HDL rica em TG tem o seu diâmetro reduzido, não conseguindo executar sua principal função, o transporte reverso do colesterol.

Além disso, o estado inflamatório promove a inibição da PON-1 (ISIK *et al*, 2007; MCMAHON *et al*, 2006), LCAT (TOMS *et al*, 2010), proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP), lipase hepática e apo A-1 (NORATA *et al*, 2006), favorecendo a oxidação da LDL e atraindo monócitos para a fagocitose das LDL oxidadas (VAN LENTEN *et al*, 2001). Dessa maneira, a HDL se torna menos efetiva na remoção do colesterol dos macrófagos (NORATA *et al*, 2006) e no transporte reverso do colesterol (ARTLE *et al*, 2002).

A apo A-1 pode ser removida da HDL pela amiloide A sérica (SAA), proteína secretada na fase aguda da inflamação, levando a perda das funções antioxidantes e anti-inflamatórias desta lipoproteína (DULLAART *et al*, 2010a; DULLAART *et al*, 2010b). Além disso, com a remoção da apo A-1, há diminuição da razão HDL-C/apo A-1, sugerindo a predominância de uma HDL pequena (CORSETTI *et al*, 2010) que pode contribuir para o aumento da incidência de aterosclerose em pacientes com AR (CHUNG *et al*, 2010), já que esta não consegue efetuar o transporte reverso do colesterol. Ainda, a apo A-1 pode estar aumentada no fluido sinovial de pacientes com AR não

tratados (ANANTH *et al*, 1993), sugerindo que as articulações podem estar sendo infiltradas por partículas de HDL (CHOY *et al*, 2009).

Já se encontra bem estabelecido que há maior incidência de doença aterosclerótica na artrite reumatóide. No entanto, a simples determinação da concentração plasmática dos lípidos, ou seja, a determinação quantitativa, não revela o impacto no risco cardiovascular, já que os resultados do HDL-C e LDL-C são contraditórios.

Dessa maneira, é de interesse verificar se há alterações qualitativas na HDL como modificações no seu tamanho e na sua capacidade de receber e doar lípidos, o que pode influenciar direta ou indiretamente no desenvolvimento da placa aterosclerótica, como também, a remoção plasmática da LDL, o que tem sido avaliado em outras situações patológicas, através da cinética plasmática de uma nanoemulsão lipídica artificial que se liga a receptores da LDL natural, marcada duplamente com colesterol livre e esterificado.

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente estudo tem como objetivo avaliar o metabolismo da LDL e os aspectos qualitativos da HDL em pacientes com AR.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a cinética plasmática de uma nanoemulsão lipídica artificial, semelhante a LDL;
- Determinar a concentração da LDL oxidada;
- Determinar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Avaliar a capacidade da HDL de receber lípidos;
- Determinar o tamanho da HDL;
- Determinar as concentrações dos lípidos, lipoproteínas e apolipoproteínas plasmáticas.

**CASUÍSTICA**

### **3. CASUÍSTICA**

#### **3.1 Local da pesquisa**

A pesquisa foi realizada no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP).

#### **3.2 Recrutamento dos participantes da pesquisa**

Foram recrutados pacientes do Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. A informação prévia detalhada de todo o protocolo foi dada a todos os participantes, antes do início do estudo. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, o qual foi preenchido em duas vias, assinado pelo paciente ou por seu responsável legal, sendo uma via entregue ao paciente e outra arquivada no prontuário, conforme a Resolução nº 196 do Conselho Nacional de Saúde de 10/10/1996. O projeto foi aprovado pela Comissão de

Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ANEXO A). O estudo tem apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Os participantes do estudo foram divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo artrite reumatoide em alta atividade (AR-AA)**

Foram convocados 14 pacientes com artrite reumatoide em alta atividade, de acordo com o índice de atividade da doença de 28 articulações (DAS28) > 5,1 (PREVOO *et al*, 1995), sendo 11 do sexo feminino e 3 do sexo masculino.

Critérios de inclusão:

- Homens ou mulheres;
- Idade acima de 18 anos;
- DAS28 > 5,1

Critérios de exclusão:

- Diabetes *mellitus* tipo 1 e 2, com níveis de glicose superiores a 100mg/dL
- Hipotireoidismo
- Insuficiência cardíaca
- Disfunção renal
- Disfunção hepática
- Hipertensão arterial sistêmica
- Doença aterosclerótica manifesta



- Tabagismo
- Ingestão de bebida alcoólica
- Triglicérides > 400mg/dL
- Obesidade em função do índice de massa corpórea (IMC):  
Critério recomendado pelo Critérios do *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel* (NCEP-ATP-III):  
IMC > 30 kg/cm<sup>2</sup>
- Uso de estatinas nos últimos 3 meses
- Gestante confirmada por teste de gravidez, no dia do estudo cinético.

- **Grupo artrite reumatoide em remissão (AR-R)**

Foram convocados 16 pacientes com artrite reumatoide em remissão de acordo com o DAS28 < 2,6, sendo 13 do sexo feminino e 3 do sexo masculino.

Critérios de inclusão:

- Homens ou mulheres;
- Idade acima de 18 anos;
- DAS28 < 2,6

Critérios de exclusão:

- Diabetes *mellitus* tipo 1 e 2, com níveis de glicose superiores a 100mg/dL

- Insuficiência cardíaca
- Hipotireoidismo
- Disfunção renal
- Disfunção hepática
- Hipertensão arterial sistêmica
- Doença aterosclerótica manifesta
- Tabagismo
- Ingestão de bebida alcoólica
- Triglicérides > 400mg/dL
- Obesidade em função do IMC: Critério recomendado pelo Critérios do *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel (NCEP-ATP-III)*: IMC > 30 kg/cm<sup>2</sup>
- Uso de estatinas nos últimos 3 meses
- Gestante confirmada por teste de gravidez, no dia do estudo cinético.

- **Grupo controle**

Foram convocados 30 indivíduos saudáveis pelo Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração (HCFMUSP), sendo 25 do sexo feminino e 5 do sexo masculino.

Critérios de inclusão:

- Homens ou mulheres;
- Idade acima de 18 anos;

- Ausência de patologia prévia

Critérios de exclusão:

- Dislipidemia, de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias
- Diabetes *mellitus* tipo 1 e 2, com níveis de glicose superiores a 100mg/dL
- Disfunção renal
- Disfunção hepática
- Hipertensão arterial sistêmica
- Doença aterosclerótica manifesta
- Obesidade em função do IMC: Critério recomendado pelo Critérios do *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel* (NCEP-ATP-III):  $IMC > 30 \text{ kg/cm}^2$
- Tabagismo
- Ingestão de bebida alcoólica
- Uso de estatinas nos últimos 3 meses
- Gestante confirmada por teste de gravidez, no dia do estudo cinético.

O número de participantes foi escolhido baseando-se em estudos de metabolismo de lipoproteínas artificiais desenvolvidos em nosso laboratório (MARANHAO *et al.*, 1992; ADES *et al.*, 2001; GRAZIANI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2005; DANTAS *et al.*, 2010).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Determinações bioquímicas

As avaliações do perfil lipídico e glicose foram realizadas no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor-HCFMUSP. Todos os participantes estavam em jejum de 12 horas.

As determinações dos níveis plasmáticos de colesterol total, TG e glicose foram realizadas através de método colorimétrico enzimático (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil). O HDL-C foi determinado pelo mesmo método utilizado para o colesterol total, após precipitação química das lipoproteínas que contêm apo B, utilizando-se reagente precipitante constituído por cloreto de magnésio e ácido fosfotúngstico. O valor do LDL-C foi calculado pela fórmula de Friedewald que é a diferença entre o colesterol total e a somatória do HDL-C e VLDL-C. O VLDL-C foi calculado através da divisão dos níveis plasmáticos de TG por 5.

$$\text{VLDL-C} = \frac{\text{TG}}{5}$$

Fórmula de Friedewald:

$$\text{LDL-C} = [\text{colesterol total} - (\text{HDL-C} + \text{VLDL-C})]$$

As concentrações plasmáticas da apo A1, apo B e apo E foram determinadas através do método turbidimétrico utilizando-se analisadores automáticos (Roche/ Hitachi – Roche Diagnostics –Mannheim).

#### **4.2 Determinação do diâmetro da partícula de HDL**

O diâmetro da partícula de HDL foi medido por espalhamento de luz (*light scattering*), utilizando o equipamento *Laser Light Scattering* (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp.). A HDL foi separada por precipitação química das lipoproteínas que contém apo B, através da adição de 500 µL polietilenoglicol 8000 (PEG) (200g/L). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em solução de cloreto de sódio (0,15M) e, em seguida, passado em filtro Millipore de 0,22 µm de diâmetro. O diâmetro da HDL foi medido por espalhamento de luz, coletados em um ângulo de 90° e 658 nm e expressos pelos resultados médio obtido em 5 corridas de 1 minuto e 30 segundos cada (LIMA *et al*, 2004).

### **4.3 Determinação da concentração plasmática de LDL oxidada**

Os níveis plasmáticos de LDL oxidada foram determinados através de método imunoenzimático (ELISA), utilizando um anticorpo monoclonal específico de rato, "Mercodia Oxidized LDL ELISA" (HOLVOET *et al.*, 1998).

### **4.4 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Foram adicionados 2g de ácido tricloroacético (TCA) a 10mL de água destilada, formando a solução de TCA. A esta solução, foram adicionados 100 µL de soro.

A solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) foi preparada adicionando 0,086g de TBA a 10mL do TCA. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida a 100°C em banho-maria por 20 minutos e resfriada em banho de gelo por mais 20 minutos.

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e submetidas a centrifugação a 8000rpm por 4 minutos, obtendo-se um sobrenadante com cor, resultante da reação de malondialdeído e outros subprodutos liberados na lipoperoxidação. Foi feita a leitura do sobrenadante no espectrofotômetro

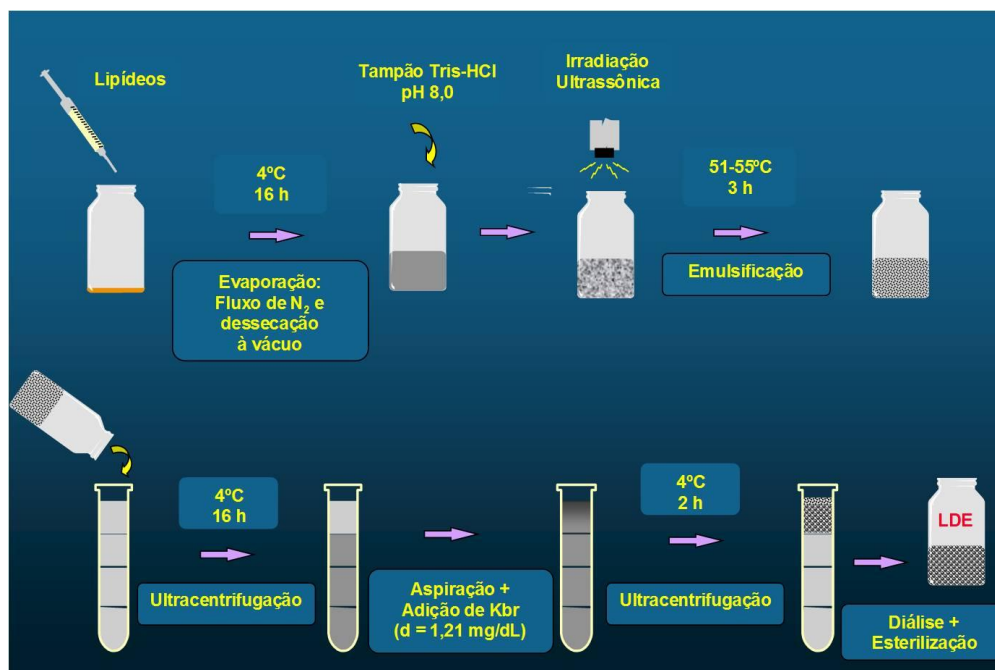
no comprimento de onda de 535nm. Os resultados foram expressos em nanomoles por miligramas de proteína (nmoles/mgprot).

#### **4.5 Preparo da nanoemulsão lipídica artificial semelhante à LDL (LDE)**

A nanoemulsão LDE foi marcada com oleato de colesterol-<sup>14</sup>C e colesterol-<sup>3</sup>H para os estudos cinéticos. Segundo a técnica descrita por Ginsburg *et al.* (1982) e modificada por Maranhão *et al.* (1993), utilizamos o seguinte procedimento: em um frasco, foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol e 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol (Sigma-Chemical Co – St Louis, EUA), a partir de estoques preparados em clorofórmio/metanol (2:1) (Merck-Darmstadt, Alemanha). Foram adicionados oleato de colesterol-<sup>14</sup>C, trioleína, fosfolípides-<sup>14</sup>C e <sup>3</sup>H - colesterol (Amersham Internacional – Reino Unido). Depois disso, a mistura foi submetida a um processo de secagem sob fluxo de nitrogênio, em banho-maria 37°C e mantida em dessecador a vácuo, por 16 horas, 4°C, para remoção dos solventes residuais. A mistura de lípides ressuspensa em tampão tris-HCl foi emulsificada por irradiação ultrassônica de 125 W de potência, durante 3 horas, sob uma atmosfera de nitrogênio, com uma variação da temperatura de 51 a 55 °C. Em seguida, a nanoemulsão foi



purificada através de duas etapas de ultracentrifugação e esterilizada através de passagem em filtro Millipore, 0,22 µm de diâmetro.



**FIGURA 5** - Preparo da nanoemulsão lipídica artificial semelhante à LDL (LDE)

#### 4.6 Estudos cinéticos com a LDE

Primeiramente, foram coletadas amostras de sangue dos pacientes, em jejum de 12 horas, para determinações bioquímicas seguida de injeção endovenosa de cerca de 100 µL de LDE, contendo 148 kBq (4µCi) de <sup>3</sup>H-colesterol e 74 kBq (2µCi) de <sup>14</sup>C-oleato de

colesterol. Após a injeção, foram coletadas amostras de sangue (5,0 mL) em tubos de ensaio contendo 250 U.I. de heparina sódica (Roche – Brasil), em intervalos pré-determinados, 5 minutos, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 r.p.m. por 15 minutos, em centrífuga Sorvall (modelo RT7, Wilmington, EUA), para obtenção de plasma. Alíquotas de 1,0 mL de plasma foram pipetadas em frascos de cintilação, foram acrescentados a esses frascos, 5,0 mL de solução Ultima Gold™ XR (Packard – Groningen, Holanda) para a determinação da radioatividade presente nas amostras, utilizando-se um contador Beta (Packard, modelo 1660 TR, EUA). As contagens obtidas foram utilizadas para o cálculo das curvas de decaimento plasmático e dos parâmetros cinéticos dos componentes lipídicos radioativos da nanoemulsão, através de um programa computacional de análise compartimental, AnaComp® versão 4.1 (MESQUITA, 1994).

#### **4.6.1 Análise dos dados cinéticos**

Nos estudos cinéticos da LDE, as contagens de radioatividade obtidas nas amostras de plasma dos pacientes nos tempos avaliados foram utilizadas para a determinação das curvas de decaimento plasmático e cálculo dos parâmetros cinéticos dos componentes lipídicos radioativos da nanoemulsão, através de análise compartimental, com a utilização de um

programa computacional desenvolvido para análise de cinética de nanoemulsões por Mesquita, C.H., do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo (MESQUITA, 1994).

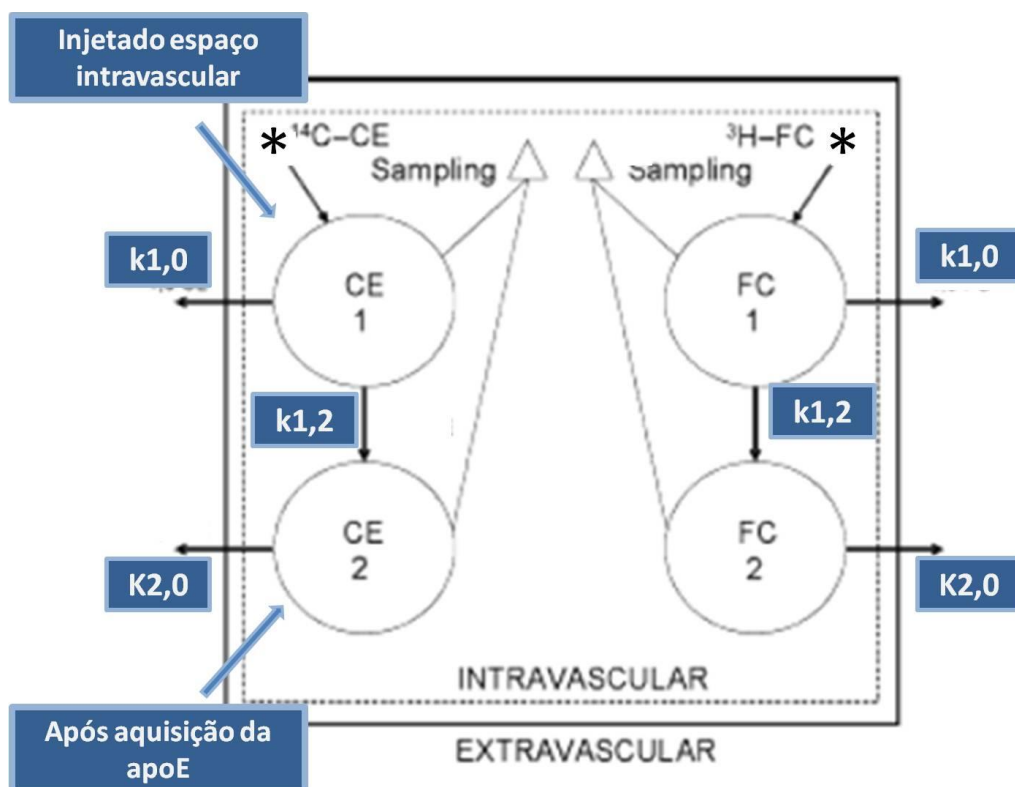
A curva de decaimento plasmático da LDE apresenta um perfil biexponencial com um rápido decaimento inicial, seguido de um decaimento mais lento. Esse perfil levou à adoção de um modelo com dois compartimentos a partir do qual foram calculados os parâmetros cinéticos (k).

Os compartimentos e os parâmetros cinéticos (figura 1) desse modelo são definidos do seguinte modo:

- compartimento 1: emulsão LDE , introduzida no espaço intravascular, assim como foi injetada;
- compartimento 2: LDE após aquisição de apolipoproteínas, no plasma;
  - $k_{1,0}$ : remoção não específica da LDE;
  - $k_{1,2}$ : transformação da LDE pela aquisição de apolipoproteínas
  - $k_{2,0}$ : remoção de LDE do compartimento plasmático para espaço extravascular.

Para representar a remoção das partículas foram utilizados os parâmetros denominados taxas fracionais de remoção (TFR), em  $h^{-1}$ , dos lípides marcados, utilizando-se as respectivas taxas fracionais de transferência (k).

$$TFR = (k_{1,0} + k_{1,2}) \times k_{2,0} / k_{1,2} + k_{2,0}$$



**FIGURA 6.** Modelo compartimental utilizado para analisar a cinética plasmática do colesterol livre e do éster de colesterol da LDE.

#### 4.6.2 Avaliação do risco radiológico relacionado aos estudos cinéticos

A dose radiológica que foi injetada foi avaliada de acordo com as normas da "International Commission on Radiological Protection" (SOWBY, 1985). O parâmetro "Annual Limit for Intake" (ALI) de radionuclídeo é definido como a quantidade de radioisótopo que induz a uma dose equivalente de 20 mSv. Para componentes orgânicos marcados com  $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$ , os valores de ALI são  $9 \times 10^7$  e  $3 \times 10^9$  Bq, respectivamente. No presente

estudo, a dose injetada de  $^{14}\text{C}$  foi de  $22,2 \times 10^4$  Bq, o que equivale a:  $(22,2 \times 10^4 \text{ Bq} / 9 \times 10^7 \text{ Bq}) \times 50\text{mSv} = 0,1233\text{mSv}$ . Para o  $^3\text{H}$ , a dose injetada foi de  $44,4 \times 10^4$  Bq, portanto a dose equivalente:  $(44,4 \times 10^4 \text{ Bq} / 3 \times 10^9 \text{ Bq}) \times 50 \text{ mSv} = 0,0075 \text{ mSv}$ .

A dose equivalente incorporada no corpo inteiro em consequência da exposição aos lípides radioativos foi estimada em 0,04 mSv, conforme avaliado pelo método MIRD - Medical Internal Radiological Dosimetry (SMITH, 1977). Em conformidade com as normas de proteção radiológica (Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1988), este valor é muito inferior ao máximo permitido, 20 mSv.

Os dados descritos para ratos pesando 0,4 kg foram ajustados para seres humanos, estimando-se um peso médio de 70 kg, utilizando-se um fator de correção com a equação seguinte:

$$KHomen = kRato \times (70\text{kg} / 0,4\text{kg})^{1-x}$$

O valor exponencial X representa uma escala de variações interespecies da farmacocinética, levando em consideração o tempo biológico de cada espécie, que varia de 0,65 a 0,95. Considerando o valor de  $X=0,86$ , estima para os seres humanos um nível plasmático total de 204 mg/dL e uma excreção diária de colesterol de 1250 mg/dia (BOXENBAUM, 1983).

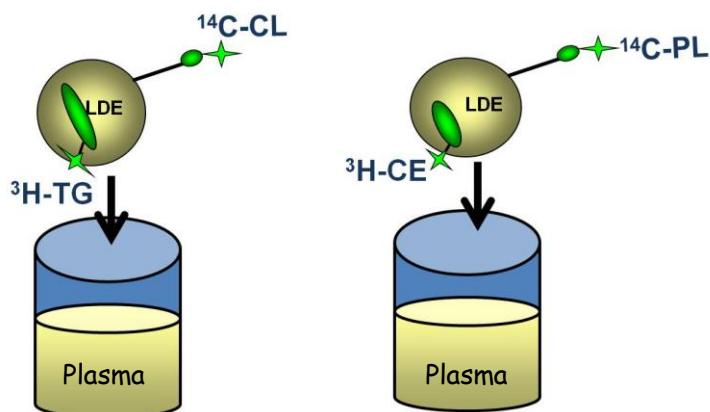
Esse valor está dentro da média descrita em avaliações laboratoriais desses parâmetros em seres humanos (MARANHÃO, 1983).

O método acima descrito permite estimar que os participantes deste estudo receberam por dose injetada de  $^{14}\text{C}$ -oleato de colesterol, 0,26 mGy

no intestino grosso inferior, 0,5 mGy no intestino grosso superior, 0,18 mGy na pele, 0,13 mGy na superfície dos ossos e 0,13 mGy no fígado. A dose recebida pelos pulmões, coração, ovários ou testículo é desprezível. Em conformidade com as normas de proteção radiológica (Comissão Nacional de Energia Nuclear), este valor é muito inferior ao máximo permitido. A dose de radiação induzida pela injeção dos radioisótopos é menor que a obtida com a maioria dos procedimentos radiológicos, sendo cerca de 10 vezes menor que a dose induzida por uma radiografia de crânio (ALTMAN, 1974).

#### 4.7 Avaliação da transferência de lípides da LDE para a HDL

Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de plasma dos participantes foi incubada com 50  $\mu\text{L}$  da nanoemulsão LDE marcada com os lípides radioativos (oleato de colesterol- $^{14}\text{C}$ , trioleína- $^3\text{H}$ , colesterol- $^3\text{H}$  e fosfolípides- $^{14}\text{C}$ ), a  $37^\circ\text{C}$ , sob agitação, durante 1 hora (Figura 7).



**FIGURA 7.** Incubação dos lípides radioativos com o plasma

Após esse procedimento, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de reagente precipitante (0,2% Dextran/0,3 mol/L  $\text{MgCl}_2$ ) seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos, a 3000 rotações por minuto. O infranadante, contendo a nanoemulsão LDE e as lipoproteínas plasmáticas que contém apo B, VLDL e LDL é desprezado. O sobrenadante, contendo a HDL, foi submetido à contagem da radioatividade presente, que corresponde à transferência dos lípides radioativos da LDE para a HDL do indivíduo. Foi calculada a percentagem de transferência de cada um dos lípides radioativos, considerando como 100%, a radioatividade total utilizada na incubação (Figura 8). Foi efetuada a correção dos valores pelo HDL-C do indivíduo e os resultados foram expressos em percentagem de lípides transferidos / mL de plasma / mg/dL de HDL-C.



**FIGURA 8.** Percentagem de transferência de lípides radioativos da LDE para a HDL

#### 4.8 Análise estatística

Todos os dados obtidos nos grupos estudados foram comparados através de testes estatísticos apropriados, dependendo de sua distribuição. Para isso, foi utilizado o teste de Kolmogorov e Smirnov.

Para análise comparativa entre os grupos artrite reumatóide e controle foi utilizado o teste *t* de Student.

Para análise comparativa entre os subgrupos de artrite reumatóide e grupo controle foi utilizado o teste de análise de multivariância ANOVA.

Os testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism version 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, e os resultados obtidos foram considerados significativamente diferentes, quando  $p < 0,05$ .



## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação clínica

Todos os pacientes foram avaliados e diagnosticados com artrite reumatóide pelo Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas baseado no critério do Colégio Americano de Reumatologia revisados em 1987 (ARNET, 1988). Durante a consulta foi aplicado o questionário de análise de saúde funcional (HAQ) (FERRAZ, 1990) e avaliada a atividade da doença (DAS28).

Ao comparar as características clínicas dos grupos artrite reumatóide e seus subgrupos com o controle, observa-se que a distribuição em relação ao sexo, idade e IMC (Tabela 1) é semelhante.

**TABELA 1** – Características clínicas dos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle

Parâmetros	Artrite Reumatóide (n=30)			Controle (n=30)
	Remissão (n=16)	Alta atividade (n=14)	Total (n=30)	
Sexo (M/F)	3/13	3/11	6/24	5/25
Idade (anos)	52±11	53±10	53±11	54±10
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27±2	28±1	28±2	28±3

IMC = índice de massa corpórea. Teste de comparação múltipla Tukey após One-Way ANOVA; Teste de comparação simples *t* de Student. Dados expressos em média ± desvio padrão.

Como verificado na Tabela 2, o tempo de diagnóstico da doença não difere entre os grupos AR-AA e AR-R, assim como a presença do fator reumatóide positivo. O grupo AR-AA possui maior índice de atividade da doença (DAS28) quando comparado ao AR-R ( $p < 0,0001$ ) e, também maior VHS ( $p < 0,05$ ). Os níveis plasmáticos de PCR não diferiram entre os grupos. (Tabela 2).

**TABELA 2** – Características clínicas e parâmetros inflamatórios relativos à artrite reumatóide dos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle

Parâmetros	Artrite Reumatóide (n=30)			Controle (n=30)
	Remissão (n=16)	Alta atividade (n=14)	Total (n=30)	
Tempo de doença	16±9	12±9	14±9	-
DAS28	1,9±0,9	5,7±0,5 ***	3,2±2	-
Fator reumatóide + (%)	12 (75)	8 (57)	20 (66)	NR
VHS (mm/h)	11±8	18±11 *	14±10	NR
PCR (mg/L)	4,2±3	6,9±10	5,3±7	NR

\* $p = 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Teste *t* de Student. DAS28=índice da atividade da doença de 28 articulações; VHS=velocidade de hemossedimentação; PCR=proteína C reativa; NR=não realizado. Dados expressos em média ± desvio padrão.

A Tabela 3 mostra a lista de medicamentos em uso pelos pacientes para o tratamento da AR. Não foram observadas diferenças nas medicações entre os grupos estudados.

**TABELA 3** – Medicamentos utilizados pelos pacientes (em %) dos grupos artrite reumatóide e seus subgrupos para tratamento da artrite reumatóide e suas comorbidades e indivíduos do grupo controle

Medicamentos	Artrite Reumatóide (n=30)			Controle (n=30)
	Remissão (n=16)	Alta atividade (n=14)	Total (n=30)	
DMARDs				
Metotrexato	11 (69)	8 (57)	19 (63)	0
Hidroxicloroquina	4 (25)	6 (43)	10 (33)	0
AINES	6 (37)	5 (36)	11 (37)	0
Prednisona	8 (50)	10 (71)	18 (60)	0

Dados expressos em valores absolutos (em %). DMARDs=medicamentos modificadores do curso da doença; AINES=antiinflamatórios não esteroidais

## 5.2 Avaliação laboratorial

Como verificado na Tabela 4, as concentrações plasmáticas de HDL-C foram maiores no grupo AR ( $p < 0,0001$ ) quando comparado ao controle. Quando os subgrupos de AR são analisados, os grupos AR-AA e AR-R também apresentaram níveis aumentados de HDL-C ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle. Ao analisarmos a relação TG/HDL, o grupo AR e seu subgrupo AR-AA possuem menor razão ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo controle. Em relação às apolipoproteínas, o grupo AR possui menor concentração de apo B ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle, não sendo observada diferenças entre os subgrupos. A relação apo B/apo A1 está diminuída no grupo AR ( $p < 0,01$ ) e no subgrupo AR-AA ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo controle. A apo E está aumentada no grupo AR

( $p < 0,01$ ) quando comparado ao controle. Em relação aos subgrupos, o AR-AA possui maiores níveis de apo E quando comparado ao controle ( $p < 0,0001$ ) e, também, ao grupo AR-R ( $p < 0,05$ ). Em relação aos demais parâmetros, não houve diferença entre os grupos estudados.

**TABELA 4 –** Concentrações plasmáticas de lípides, apolipoproteínas e glicose (mg/dL) dos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle

Parâmetros	Artrite Reumatóide (n=30)			Controle (n=30)
	Remissão (n=16)	Alta atividade (n=14)	Total (n=30)	
Colesterol (mg/dL)				
Total	202±37	198±39	203±36	200±45
LDL	119±31	128±40	123±35	121±39
HDL	62±18 ***	70±19 ***	65±18 ***	44±11
não-HDL	140±33	149±45	144±38	149±47
Colesterol livre	54±17	49±17	52±16	55±15
LDLox	58±18	49±20	53±19	63±28
TBARS	4,82±3,3	2,78±2,1	3,9±2,9	3,4±1,6
Triglicérides				
TG/HDL	2±1,5	1,6±0,8 *	1,8±1,2 *	2,9±2
Apolipoproteínas (mg/dL)				
A1	136±30	159±26	146±30	134±26
B	70±9	68±20	69±14 *	82±19
B/A1	0,53±0,12	0,43±0,13 **	0,49±0,13 **	0,63±0,24
E	5±0,8	6±1 ***†	5±1 **	4,1±1,3
Glicose (mg/dL)				
	87±9	86±8	88±12	85±9

\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo controle; \*\*\* $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle; † $p < 0,05$  quando comparado ao grupo remissão. Teste ANOVA com pós-teste de Tukey; Teste *t* de Student. LDL=lipoproteína de baixa densidade; HDL=lipoproteína de alta densidade; LDLox=lipoproteína de baixa densidade oxidada; TG=triglicérides. Dados expressos em média ± desvio padrão.

### 5.3 - Medida do diâmetro da HDL e taxa de transferência de colesterol livre, colesterol éster, fosfolípidos e triglicérides da nanoemulsão para a HDL

Como verificado na Tabela 5, há uma diminuição no diâmetro da HDL entre o grupo AR ( $p<0,01$ ) quando comparado ao grupo controle. Essa diferença se mantém quando os subgrupos AR-AA e AR-R são comparados ao grupo controle (ambos  $p<0,05$ ).

Em relação às transferências dos lípidos da nanoemulsão para a HDL, houve uma diminuição apenas na transferência do colesterol éster no grupo AR e seus subgrupos ( $p<0,01$ ) quando comparado ao grupo controle. As transferências de colesterol livre, fosfolípidos e triglicérides foram similares entre os grupos estudados (Tabela 6).

**TABELA 5** – Diâmetro da HDL nos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle

Parâmetros	Artrite reumatóide (n=30)			Controle (n=30)
	Remissão (n=16)	Alta atividade (n=14)	Total (n=30)	
Diâmetro da HDL (nm)	8,5±0,6 *	8,6±0,4 *	8,5±0,5 **	9,2±0,8

\* $p<0,05$  quando comparado ao grupo controle; \*\* $p<0,01$  quando comparado ao grupo controle; Teste ANOVA com pós-teste de Tukey; Teste *t* de Student. Dados expressos em média ± desvio padrão.

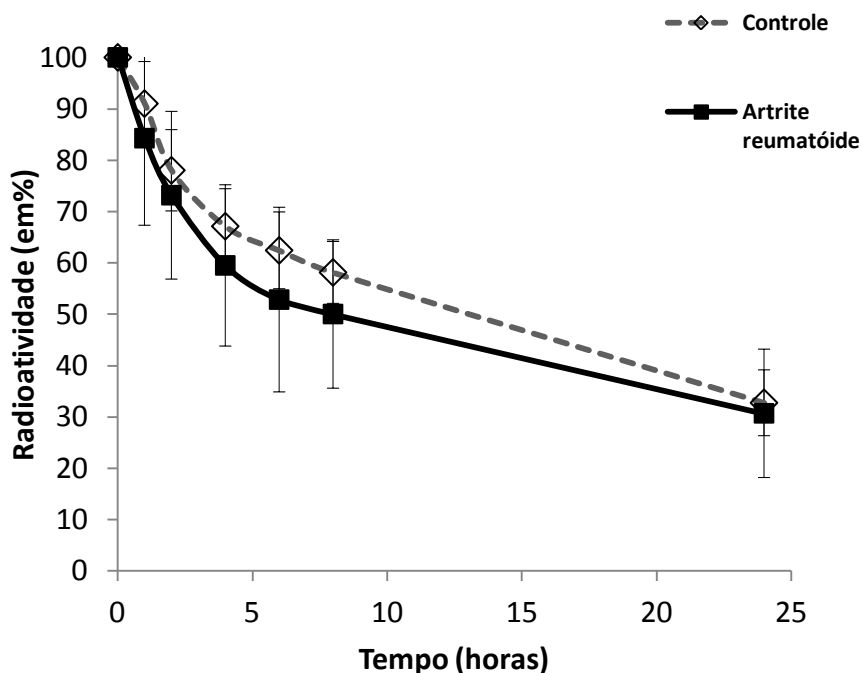
**TABELA 6** – Transferência de colesterol livre, colesterol éster, fosfolípides e triglicérides de uma nanoemulsão para a HDL em % da radioatividade total de cada nanoemulsão lipídica nos grupos artrite reumatóide, seus subgrupos e controle

Parâmetros	Artrite reumatóide (n=30)			Controle (n=30)
	Remissão (n=16)	Alta atividade (n=14)	Total (n=30)	
<sup>14</sup> C-Colesterol livre	7±1	7±1	7±1	7±1
<sup>3</sup> H-Colesterol éster	3±1 **	3±1 **	3±1 **	4±1
<sup>14</sup> C-Fosfolípides	20±2	21±2	20±3	22±3
<sup>3</sup> H-Triglicérides	4±1	4±1	4±1	4±1

\*\*p<0,01 quando comparado ao grupo controle; Teste ANOVA com pós-teste de Tukey; Teste *t* de Student. Dados expressos em média ± desvio padrão.

#### 5.4 Decaimento plasmático do colesterol livre e do éster de colesterol da LDE

A taxa fracional de remoção do éster de colesterol (TFR-EC-<sup>14</sup>C) foi maior no grupo artrite reumatóide (p<0,05) quando comparado com o grupo controle (Figura 9). Em relação às taxas de transferências representadas por k<sub>1,0</sub>, k<sub>1,2</sub> e k<sub>2,0</sub>, o único parâmetro com diferença significativa foi o k<sub>1,2</sub>, com uma taxa maior quando comparado ao grupo controle (p<0,05). O k<sub>2,0</sub> do grupo AR apresentou uma tendência a elevação da taxa quando comparado ao grupo controle (p=0,06). Não foi observada diferença entre os subgrupos de AR (Tabela 7).



**FIGURA 9.** Curva de remoção plasmática do éster de colesterol no grupo artrite reumatóide e grupo controle

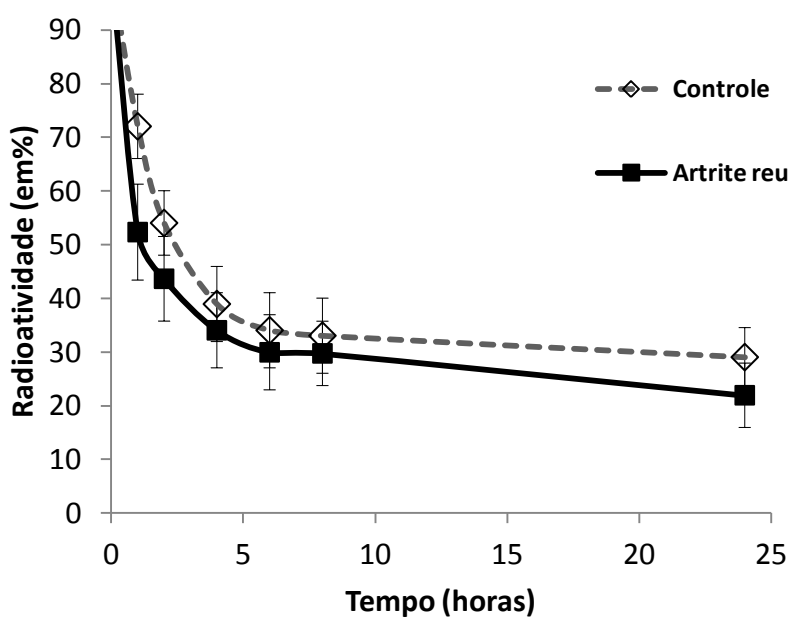
**TABELA 7** – Taxa fracional de remoção (TRF) e taxas de transferência dos lípides ( $k$ ) do éster de colesterol ( $EC-^{14}C$ ) da nanoemulsão LDE (em  $h^{-1}$ ) nos grupos artrite reumatóide, subgrupos e controle

Parâmetros	Artrite Reumatóide (n=30)			Controle (n=30)
	Remissão (n=16)	Alta atividade (n=14)	Total (n=30)	
TFR- $EC-^{14}C$	0,0674±0,050	0,0785±0,0864	0,0727±0,066 *	0,0375±0,027
$k_{1,0} EC-^{14}C$	0,494±0,66	0,675±1,136	0,575±0,89	0,278±0,213
$k_{1,2} EC-^{14}C$	0,0473±0,030	0,0415±0,02	0,044±0,02 *	0,024±0,019
$k_{2,0} EC-^{14}C$	0,0256±0,02	0,026±0,024	0,0258±0,02	0,005±0,006

\* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; Teste ANOVA com pós-teste de Tukey; Teste  $t$  de Student. TFR=taxa fracional de remoção; EC=éster de colesterol;  $k$ =taxa de transferência dos lípides. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



A taxa fracional de remoção do colesterol livre (TFR-CL- $^3\text{H}$ ) foi maior no grupo artrite reumatóide ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle (Figura 10), não havendo diferença entre os subgrupos de AR em relação ao controle. As taxas de transferências representadas por  $k_{1,0}$ ,  $k_{1,2}$  e  $k_{2,0}$  foram maiores no grupo AR quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente). Ao analisarmos os ks nos subgrupos de AR, o  $k_{1,0}$  é maior no grupo AR-AA quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e o  $k_{2,0}$  é maior nos grupos AR-AA e AR-R quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Em relação ao  $k_{1,2}$  não houve diferença entre os subgrupos de AR e na comparação com o grupo controle (Tabela 8).



**FIGURA 10.** Curva de remoção plasmática do colesterol livre no grupo artrite reumatóide e grupo controle

**TABELA 8** – Taxa fracional de remoção (TFR) e taxas de transferência de lípides (k) do colesterol livre (CL-<sup>3</sup>H) da nanoemulsão LDE (em h<sup>-1</sup>) nos grupos artrite reumatóide, subgrupos e controle

Parâmetros	Artrite Reumatóide (n=30)			Controle (n=30)
	Remissão (n=16)	Alta atividade (n=14)	Total (n=30)	
TFR-CL- <sup>3</sup> H	0,0663±0,045	0,0682±0,0415	0,0663±0,042 *	0,0357±0,039
k1,0 CL- <sup>3</sup> H	0,988±0,341	1,230±0,47 *	1,095±0,41 **	0,708±0,124
k1,2 CL- <sup>3</sup> H	0,0476±0,17	0,815±0,97	0,672±0,66 *	0,357±0,08
k2,0 CL- <sup>3</sup> H	0,0256±0,02 *	0,026±0,024 *	0,0258±0,02 **	0,005±0,006

\*p<0,05 quando comparado ao grupo controle; \*\*p<0,01 quando comparado ao grupo controle. Teste ANOVA com pós-teste de Tukey; Teste *t* de Student. TFR=taxa fracional de remoção; CL=colesterol livre; k=taxa de transferência dos lípides. Dados expressos em média ± desvio padrão.

**DISCUSSÃO**

## 6. Discussão

A artrite reumatóide vem sendo associada constantemente à doença cardiovascular. Esta associação se deve a presença de novos fatores riscos como inflamação sistêmica (STEVENS 2005), e àqueles já bem estabelecidos como hipertensão, obesidade, sedentarismo e dislipidemia (MISHRA *et al*, 2011). Dentre esses fatores, a alteração nos níveis plasmáticos de lípidos é um forte preditor de doença aterosclerótica na população em geral e tem alta prevalência na AR. Vários estudos têm demonstrado perfil pró-aterogênico em pacientes com AR, porém os dados disponíveis são contraditórios e não refletem o verdadeiro impacto no risco cardiovascular. Sendo assim, outras implicações fisiopatológicas podem estar envolvidas para o desenvolvimento de aterosclerose prematura nesses pacientes, como a presença de LDL pequena e densa e/ou a velocidade da remoção plasmática da LDL.

Neste estudo, apesar das concentrações de LDL-C não diferirem entre os grupos estudados, a velocidade da remoção plasmática da LDL calculada pela TFR da LDE marcada duplamente com  $^{14}\text{C}$ -colesterol éster e  $^3\text{H}$ -colesterol livre foi maior nos pacientes com AR quando comparados ao grupo controle enquanto a concentração de apo B foi menor nesses pacientes.

Os remanescentes de VLDL, IDL e LDL, que é o produto final da lipólise da VLDL, são removidos da circulação sanguínea, principalmente, por receptores de LDL. Esses receptores reconhecem a apo B, que é uma proteína que está presente em todas as partículas da cascata da VLDL e,

também, apoE, proteína presente nos produtos de degradação da VLDL, exceto na LDL. A composição da nanoemulsão LDE é semelhante a da LDL natural, no entanto, não possui proteína associada. Entretanto, em contato com o plasma, a LDE adquire apo E que é reconhecida pelos receptores de LDL. A LDE é removida do plasma mais rapidamente quando comparada a LDL natural. Isto se deve a maior afinidade do receptor de LDL pela apo E.

O modelo LDE é uma abordagem prática para avaliar a função *in vivo* do receptor de LDL. O método foi validado em estudos clínicos nos quais a nanopartícula mostrou ter comportamento similar ao da LDL natural. Assim como observado com a LDL natural, a TFR da LDE na hipercolesterolemia familiar está diminuída devido à deficiência dos receptores em internalizar esta partícula (SANTOS *et al*, 2005). Em contrapartida, a TFR é acelerada quando há aumento da atividade ou de expressão dos receptores de LDL. Isto pode ocorrer durante o tratamento com estatinas que leva a superexpressão dos receptores de LDL (SANTOS *et al*, 2005) e, também na leucemia mielocítica aguda (MARANHÃO *et al*, 1992) e nos linfomas (PINHEIRO *et al*, 2005), onde há maior proliferação celular devido a maior necessidade de lípidos para síntese de novas membranas celulares. Esta proliferação celular pode ocorrer também em tecidos não-malignos afetados por um processo inflamatório que leva ao aumento da captação da LDE. Um estudo em coelhos com artrite, induzida por injeção de albumina metilada, mostrou uma maior captação da LDE pelo tecido inflamatório da articulação acometida quando comparada ao tecido da articulação controle (dados não publicados).

A presença de tecidos com maior expressão de receptores de LDL pode aumentar os sítios de captação da LDL, diminuindo tanto a concentração plasmática da lipoproteína quanto da sua proteína específica, a apo B. Esta apolipoproteína é um marcador de todos os remanescentes de VLDL, em particular, da LDL, já que há apenas uma apo B em cada partícula.

O fato da LDE ser removida mais rapidamente na AR com diminuição dos níveis de apo B sugere-se que os sítios inflamatórios e proliferativos podem estar envolvidos no aumento da captação da LDE. Dessa maneira, a LDE poderia ser usada como veículo de fármacos visando o tratamento da AR por concentrar os fármacos nos pontos de inflamação e proliferação.

A análise compartimental indica que a diferença na TFR entre AR e controle é explicada pelo aumento do  $k_{1,2}$ . A taxa de transferência representada por  $k_{1,0}$  demonstra a remoção não específica da LDE. Após a saída deste primeiro compartimento, o parâmetro representado por  $k_{1,2}$  indica a aquisição de apo E pela LDE. Esta aquisição permite a remoção final desta partícula pela interação da apo E com receptores específicos, representados pelo  $k_{2,0}$ , o qual mostrou uma tendência de aumento nos pacientes com AR.

O aumento da taxa de transferência do  $k_{1,2}$  e a tendência a elevação da taxa representada pelo  $k_{2,0}$ , que leva a aceleração da TFR da nanopartícula, pode ser explicado pelas elevadas concentrações plasmáticas de apo E encontradas na AR.

A TFR do colesterol livre da LDE também foi maior na AR, sendo similar à TFR do colesterol esterificado. Esses dados sugerem que o colesterol livre permanece na nanopartícula na circulação sanguínea, assim como no grupo controle. Entretanto, a taxa de transferência  $k_{1,0}$  do colesterol livre foi maior no grupo AR comparando-se com o controle, o que não ocorreu com o  $k_{1,0}$  do colesterol esterificado.

Além disso, no grupo AR, o  $k_{1,0}$  do colesterol livre foi maior do que o  $k_{1,0}$  do colesterol esterificado. Esses dados sugerem que na AR, o colesterol livre tem uma maior dissociação da nanopartícula, antes da aquisição das apoB pela mesma, que poderiam dificultar a sua saída. Isso pode ter uma implicação importante, pois a taxa  $k_{1,0}$  representa a saída não específica do colesterol livre, ou seja, captação por macrófagos, que sabidamente encontram-se aumentados na AR (RHO *et al*, 2011). Pode-se então sugerir que, na AR o colesterol livre da LDL tem uma maior facilidade de transferência para os macrófagos presentes na parede arterial. A deposição de colesterol livre pode alterar o metabolismo das células endoteliais e células musculares lisas, induzindo a secreção de fatores pró-inflamatórios e apoptose em macrófagos, que representam importantes características de placas de ateroma. Nesse sentido, em estudos anteriores, foi demonstrada uma maior remoção de colesterol livre da LDE em pacientes com DAC (SANTOS *et al*, 2003) e uma maior deposição de colesterol livre, comparando-se com colesterol esterificado, em fragmentos de vasos de pacientes submetidos à revascularização (COUTO *et al*, 2007).

Os níveis plasmáticos de LDL oxidada e de malondialdeído (produto final da peroxidação lipídica) foram semelhantes entre os grupos estudados, provavelmente devido à concentração normal de colesterol que estes grupos apresentam, já que níveis aumentados deste lipídeo levam à geração de radicais livres e, conseqüentemente, à peroxidação lipídica (PRASAD *et al*, 2003). Mishra *et al* (2011) encontraram correlação positiva entre as concentrações de malondialdeído e PCR com as de colesterol, mostrando que o estresse oxidativo e a inflamação poderiam contribuir com o desenvolvimento da dislipidemia. No entanto, esta correlação não foi encontrada em nosso estudo, provavelmente porque os pacientes com AR não apresentaram perfil lipídico alterado.

As concentrações plasmáticas de colesterol livre não diferiram entre os pacientes com AR e os indivíduos controles, o que pode indicar que a esterificação do colesterol, a qual ocorre principalmente na HDL com subseqüentes transferências lipídicas para outras classes de lipoproteínas, não é afetada pela AR.

É importante ressaltar que o HDL-C foi maior na AR quando comparado ao grupo controle, um efeito que pode estar associado ao tratamento com corticosteróides e cloroquina. No entanto, a principal proteína presente na HDL, a apo A1, não diferiu entre os grupos. Além disso, no grupo AR, a HDL apresentou menor diâmetro quando comparado ao grupo controle. Apesar dos resultados na literatura serem controversos, a maioria dos estudos sugere que a HDL de menor tamanho tem uma menor capacidade de exercer sua função de transporte reverso de colesterol.



A HDL é constantemente remodelada no plasma devido a contínuas transferências lipídicas. Esta lipoproteína é originada por meio da lipidação da apo A1 que resulta em uma partícula nascente discóide. A HDL recebe colesterol livre das células em um processo mediado pelo complexo ABCA1 e o esterifica pela LCAT, usando apo A1 como co-fator e fosfolípidos. Dessa maneira, a partícula se torna madura e com formato arredondado. No transporte reverso do colesterol, o HDL-C é retirado da circulação sanguínea por receptores específicos no fígado e pode ser excretado na bile ou transferido para as outras lipoproteínas que contêm apo B, como a VLDL e LDL. Esta transferência lipídica, avaliada neste estudo por um método *in vitro* usando a LDE como doadora de lípidos para a HDL, é essencial para o metabolismo da HDL na circulação e para o transporte reverso do colesterol.

Além do transporte reverso do colesterol, principal função da HDL para manter a homeostase do colesterol no organismo, a HDL possui inúmeras funções relacionadas ao seu papel antiaterogênico. A composição da HDL, em parte dependente da transferência lipídica, pode interferir em suas funções antiaterogênicas, alterando a afinidade das proteínas que mantêm a estrutura desta partícula e pelas quais a HDL exerce suas funções.

Neste estudo, observou-se uma redução da transferência do colesterol esterificado da LDE para a HDL em pacientes com AR. Essa redução pode estar relacionada a alterações no metabolismo da HDL, as quais podem favorecer o processo aterogênico. Nesse sentido, a menor transferência de colesterol esterificado para a HDL foi associada,

anteriormente, com a presença de DAC em idosos (AZEVEDO *et al*, 2011) e com transplante cardíaco (PUK *et al*, 2009).

Os achados deste estudo sugerem que na AR ocorra um aumento na remoção plasmática da LDL e uma menor transferência de colesterol esterificado da LDL para a HDL, além de uma maior chance de deposição de colesterol livre na parede arterial, provavelmente pela presença macrófagos e por todo o processo inflamatório envolvido. Portanto, os resultados do presente estudo mostram importantes mecanismos de aterogenicidade que podem estar relacionados a uma maior incidência de doenças cardiovasculares em pacientes com artrite reumatóide.

**CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

- A cinética plasmática da nanoemulsão lipídica artificial semelhante à LDL foi mais rápida em pacientes com artrite reumatóide quando comparados ao grupo controle.
- A concentração de LDL oxidada e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico não diferiram entre os grupos estudados.
- A HDL recebeu menos colesterol esterificado da nanoemulsão lipídica.
- Em pacientes com artrite reumatóide, a HDL possui menor diâmetro, no entanto, o seu colesterol está aumentado.
- As concentrações de apo B estão diminuídas enquanto os níveis séricos de apo E estão aumentados nos pacientes com artrite reumatóide. A apo A não diferiu entre os grupos estudados.

**ANEXO**

## 8. ANEXO A – Termo de consentimento

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

#### MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Cinética plasmática de uma nanoemulsão lipídica artificial, semelhante a LDL em pacientes com artrite reumatóide.  
PESQUISADOR : Fernanda Santos Pozzi  
CARGO/FUNÇÃO: Biomédica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRBM 12104  
UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Metabolismo de Lípidos – Instituto do Coração e Ambulatório de Reumatologia do HCFMUSP
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:  
RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO   
RISCO BAIXO  RISCO MAIOR
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

## **HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

A pessoa que tem artrite reumatóide tem maior risco de ter doenças do coração (infarto) e derrame cerebral, por causa de alguns fatores, principalmente a diminuição do “colesterol bom”, a HDL, e aumento do “colesterol ruim”, a LDL.

Esse estudo tem como objetivo verificar quanto tempo a LDL fica no seu sangue e, também, verificar a qualidade da HDL.

Para isso, será feita uma injeção na veia, de um volume muito pequeno (100 µL, ou seja, volume 10 vezes menor que 1 mL) de uma substância parecida com a LDL. Ela possui radioatividade em uma quantidade muito baixa, 1000 vezes menor que a dose permitida. Depois serão feitas 7 coletas de sangue (5 mL cada) durante o dia, seis delas no mesmo dia (começando às 8:00 horas da manhã e terminando às 16:00 horas) e a última, no dia seguinte às 8:00 horas da manhã. Antes da injeção, na mesma veia, será tirada uma amostra de sangue para fazer outros exames relacionados com a gordura no sangue.

Os riscos decorrentes desses exames são mínimos, relacionados à picada na veia que pode deixar uma mancha roxa no local.

A qualquer momento, qualquer dúvida sobre como os exames são feitos, a importância de serem feitos e sobre o risco para a sua saúde será esclarecida imediatamente pelos pesquisadores. A principal investigadora é Fernanda Pozzi e sua coordenadora é Dra Carmen Vinagre, que podem ser encontradas no endereço: Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – 1º subsolo, Bloco II – telefone: 3069-5574. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

Se você desistir de continuar no estudo, isso será aceito imediatamente, sem nenhum problema com qualquer outro tratamento que estiver fazendo na Instituição.

Todos os resultados obtidos no estudo serão guardados com os responsáveis e nada será passado à ninguém sem sua autorização. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Além disso, você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Se você tiver qualquer problema durante sua participação na pesquisa, mesmo que não esteja relacionado ao exame, você será atendido imediatamente por médicos do nosso departamento.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Cinética plasmática de uma nanoemulsão lipídica artificial, semelhante a LDL em pacientes com artrite reumatóide”.

Eu discuti com a Dra Fernanda Pozzi sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

-----

Assinatura do paciente/representante  
legal

Data     /     /

-----

Assinatura da testemunha

Data     /     /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----

Assinatura do responsável pelo estudo

Data     /     /



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-RAYA A & ABOU-RAYA S. Inflammation: A pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis. *Autoimmune Reviews*. 2006; 5: 331-7.
- ADES A, CARVALHO JP, GRAZIANI SR, AMANCIO RF, *et al*. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol*. 2001; 82: 84-7.
- ALKAABI JK, HO M, LEVISON R, PULLAR T, *et al*. Rheumatoid arthritis and macrovascular disease. *Rheumatology*. 2003; 42: 292-7.
- ALTMAN PL. & DITTMER DS. *Biology Data Book*. In: ALTMAN PL; DITTMER DS, eds. *Federation of the American Societies for Experimental Biology*. Vol. III, Bethesda, Maryland, USA, 1974.
- ANANTH L, PRETE PE, KASHYAP ML. Apolipoproteins A-I and B and cholesterol in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Metabolism*. 1993; 42: 803-6.
- ARNETT FC, EDWORTHY SM, BLOCH DA. *et al*. The American Rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988; 31: 315-24.
- ARTLE A, MARSCHE GP, PUSSINEN P, *et al*. Impaired capacity of acute-phase high density lipoprotein particles to deliver cholesteryl ester to the human HUH-7 hepatoma cell line. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34: 370-81.

- ASANUMA Y, KAWAI S, AOSHIMA H, *et al.* Serum lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotypes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 443-7.
- ASSMANN G, SCHULTE H, FUNKE H, *et al.* The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *Eur Heart J.* 1998; 19: M8-M14.
- AUSTIN MA. Refining and expanding the role of small, dense low-density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2009; 207: 350-1.
- AUSTIN MA, HAKANSON JE, EDWARDS KL: Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol.* 1998; 81: 7B-12B.
- AZEVEDO CHM, Wajngarten M, LO PRETE AC, DIAMENT J, MARANHAO RC: Simultaneous transfer of cholesterol, triglycerides, and phospholipids to high-density lipoprotein in aging subjects with or without coronary artery disease. *Clinics.* 2011; 66(9): 1543-1548.
- BACON PA, TOWNSEND JN. Nails in the coffin: Increasing evidence for the role of rheumatic disease in the cardiovascular mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 2707-10.
- BOERS M, NURMOHAMED MT, DOELMAN CJ, *et al.* Influence of glucocorticoids and disease activity on total and high density lipoprotein cholesterol in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 842-5.
- BOXENBAUM H. Evolutionary biology, animal behavior, fourth-dimensional space, and the *raison d'etre* of drug metabolism and pharmacokinetics. *Drug Metab Rev.* 1983; 14: 1057-97.

- BRENOL CV, MONTICIELO OA, XAVIER RM, BRENOL JCT. Artrite reumatóide e aterosclerose. *Rev Assoc Med Bras.* 2007; 53: 465-70.
- CABANA VG, LUKENS JR, RICE KS, *et al.* HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease. *J Lipid Res.* 1996; 37: 2662-74.
- CHOI HK, SEEGER JD. Lipid profiles among US elderly with untreated rheumatoid arthritis – the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Rheumatol.* 2005; 32: 2311-6.
- CHOY E, SATTAR N. Interpreting lipid levels in the context of high-grade inflammatory states with a focus on rheumatoid arthritis: a challenge to conventional cardiovascular risk actions. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 460-9.
- CHUNG CP, OESER A, RAGGI P, *et al.* Lipoprotein subclasses determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy and coronary atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2010; 37: 1633-8.
- CORSETTI JP, GANSEVOORT RT, SPARKS CE, *et al.* Inflammation reduces HDL protection against primary cardiac risk. *Eur J Clin Invest.* 2010; 40: 483-9.
- COUTO RD, Dallan LA, Lisboa LA, Mesquita CH, Vinagre CG, Maranhão RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. *Lipids.* 2007; 42(5): 411-8.

- DAI L, LAMB DJ, LEAKE DS, *et al.* Evidence for oxidized low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Free Radic Res.* 2000; 32: 479-86.
- DANTAS SA, FICKER ES, VINAGRE CG, *et al.* Metabolism of a lipid nanoemulsion resembling low-density lipoprotein in patients with grade iii obesity. *Clinics.* 2010; 65 :23-7.
- DEL RINCÓN ID, WILLIAMS K, STERN MP, FREEMAN GL, ESCALANTE A: High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 2737-45.
- DESSEIN PH, JOFFE BI, VELLER MG, *et al.* Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in RA. *J Rheumatol.* 2005; 32: 435-42.
- DIAS PMT, MEZZOMO A, PETEFFI C, *et al.* Homocisteína: Um fator de risco vascular. *Revista Científica da AMECS.* 2001; 10: 1-6.
- DORIA A, SHERER Y, MERONI PL, *et al.* Inflammation and accelerated atherosclerosis: basic mechanisms. *Rheum Dis Clin N Am.* 2005; 31: 355-62.
- DULLAART RPF, PERTON F, KAPPELLE PJWH, *et al.* Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity modifies the inverse relationship of C-reactive protein with HDL cholesterol in nondiabetic men. *Biochim Biophys Acta.* 2010a; 1801: 84-8.
- DULLAART RPF, PERTON F, VAN DER KLAUW MM, *et al.* High plasma lecithin: cholesterol acyl-transferase activity does not predict low

incidence of cardiovascular events: possible attenuation of cardioprotection associated with high HDL cholesterol. *Atherosclerosis*. 2010b; 208: 537-42.

DURSUNOGLU D, EVRENGUL H, POLAT B, *et al.* Lp(a) lipoprotein and lipids in patients with rheumatoid arthritis: serum levels and relationship to inflammation. *Rheumatol Int*. 2005; 25: 241-5.

EISENBERG S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 1984; 25: 1017-58.

FERRAZ MB, OLIVEIRA LM, ARAÚJO PM, *et al.* Crosscultural reliability of the physical ability dimension of the health assessment questionnaire. *J Rheumatol*. 1990; 17: 813-7.

FLEMING A, CROW JM, CORBETT M. Early rheumatoid disease. I – Onset II – Patterns of joint involvement. *Ann Rheum Dis*. 1976; 35: 357-63.

GEORGIADIS AN, PAPVASILOIOU EC, LOURIDA ES, *et al.* Atherogenic lipid profile is a feature characteristic of patients with early rheumatoid arthritis: effect of early treatment – a prospective, controlled study. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8: R82.

GINSBURG GS, SMALL DM, ATKINSON D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1982; 257: 8216-27.

GLOMSET JA, NICHOLS AV, NORUM KR, *et al.* Plasma lipoproteins in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency. Further studies of very low and low density lipoprotein abnormalities. *J Clin Invest*. 1973; 52: 1078-92.

- GOLDSTEIN JL, ANDERSON RGW.; BROWN MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 1979; 279: 679-85.
- GOODSON NJ, SOLOMON DH. The cardiovascular manifestations of rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumtol*. 2006; 18:135-40.
- GOTTO AM. High density lipoproteins: biochemical and metabolic factors. *Am J Cardiol*. 1983; 52: 2-4.
- GRAZIANI SR, IGREJA FA, HEGG R, *et al*. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol*. 2002; 85:493-7.
- GRUNFELD C, FEINGOLD KR. Tumor necrosis factor, interleukin and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992; 200: 224-7.
- GUBA, S.C. *et al*.: Hyperhomocysteinemia - na emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. *Clin.Chem* 1996; 166: 709-22.
- HELDENBERG D, CASPI D, LEVTOV O, *et al*. Serum lipids and lipoprotein concentrations in women with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 1983; 2:387-91.
- HOLVOET P, VANHAECKE J, JANSSENS S, *et al*. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation*. 1998; 98: 1487-94.
- HOOTMAN JM, HELMICK CG. Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 226-9.

- ISIK A, KOCA SS, USTUNDAG B, *et al.* Paraoxonase and arylesterase levels in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2007; 26: 342-8.
- KAGEYAMA N, NOMURA M, NAKAYA Y, *et al.* Relationship between adhesion molecules with hs-CRP and changes therein after ARB (Valsartan) administration in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Med Invest.* 2006; 53: 134-9.
- KAMIGAKI AS, SISCOVICK DS, SCHWARTZ SM, *et al.* Low density lipoprotein particle size and risk of early-onset myocardial infarction in women. *Am J Epidemiol.* 2001; 153: 939-45.
- KAVANAUGH A. Dyslipoproteinaemia in a subset of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53:551-2.
- KEREKES G, SZEKANECZ Z, DÉR H, *et al.* Endothelial dysfunction and atherosclerosis in rheumatoid arthritis: a multiparametric analysis using imaging techniques and laboratory markers of inflammation and autoimmunity. *J Rheumatol.* 2008; 35: 398-406.
- KHAN M, PELENGARIS S, COOPER M, *et al.* Oxidised lipoproteins may promote inflammation through the selective delay of engulfment but not binding of apoptotic cells by macrophages. *Atherosclerosis.* 2003; 171: 21-9.
- KHOVIDHUNKIT W, KIM MS, MEMON RA, *et al.* Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1169-96.
- KIM SH, LEE CK, LEE EY, *et al.* Serum oxidized low-density lipoproteins in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2004; 24: 230-3.



- LAKATOS J, HARSAGYI A. Serum total, HDL, LDL cholesterol and triglyceride levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 1988; 21: 93-6.
- LAZZERINI PE, SELVI E, LORENZINI S, *et al.* Homocysteine enhances cytokine production in cultured synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2006; 24: 387-93.
- LIBBY P, RIDKER P, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105: 1135-43.
- LIMA ES, MARANHAO RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin. Chem.* 2004; 50: 1086-8.
- LORBER M, AVIRAM M, LINN S, *et al.* Hypocholesterolaemia and abnormal high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1985; 24: 250-5.
- MARADIT-KREMERS H, NICOLA PJ, CROWSON CS, *et al.* Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 722-32.
- MARANHÃO RC, CESAR TB, PEDROSO-MARIANI S, *et al.* Metabolic behavior in rats of a non-protein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids.* 1993; 28: 691-6.
- MARANHAO RC, GARICOCHEA B, SILVA EL, *et al.* Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. *Braz J Med Biol Res.* 1992; 25: 1003-7.

- MARANHÃO RC, ROLAND IA, TOFFOLETTO O, *et al.* Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. *Lipids*. 1997; 32: 627-33.
- MARIK PE. Dyslipidemia in the critically ill. *Crit Care Clin*. 2006; 22: 151-9.
- MAYER EL, JACOBSEN DW, ROBINSON K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1996; 27: 517-27.
- MCENTERGART A, CAPELL HA, CRERAN D, *et al.* Cardiovascular risk factors, including thrombotic variables, in a population with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2001; 40: 640-4.
- MCMAHON M, GROSSMAN J, FITZGERALD J, *et al.* Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006; 54: 2541-9.
- MESQUITA CH. Cinética do quilomícron marcado com  $^3\text{H-TG}$  e  $^{14}\text{C-CE}$ . Análise compartimental auxiliar. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), 1994. [Publicações IPEN]
- MISHRA R, SINGH A, CHANDRA V, *et al.* A comparative analysis of serological parameters and oxidative stress in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2011; IN PRESS.
- MONTEIRO RDC & ZANINI AC. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatoide. *Braz J Pharma Sci*. 2008; 44.
- MOTA LMH, LAURINDO IMM, NETO LLS. Avaliação prospectiva da qualidade de vida em uma coorte de pacientes com artrite reumatoide inicial. *Rev Bras Reumatol*. 2010; 50: 249-61.

- MYASOEDOVA E, CROWSON CS, MARADIT-KREMERS H, *et al.* Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70: 482-7.
- NAVAB M HAMA SY, ANANTHARAMAIAH GM, *et al.* Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1495-1508.
- NAVAB M, IMES SS, HAMA SY, *et al.* Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1991; 88: 2039-46.
- NORATA GD, PIRILLO A, CATAPANO AL. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006; 16: 371-86.
- NURMOHAMED MT & DIJKMANS BAC. Dyslipidaemia, statins and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68; 453-5.
- PANOULAS VF, METSIOS GS, PACE AV, *et al.* Hypertension in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2008; 47: 1286-98.
- PARK YB, CHOI HK, KIM MY, *et al.* Effects of antirheumatic therapy on serum lipid levels in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Am J Med.* 2002; 15: 188-98.
- PARK YB, LEE SK, LEE WK, *et al.* Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1999; 26: 1701–4.

- PEARSON TA, MENSAH GA, ALEXANDER RW, *et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003; 107: 499-511.
- PETERS MJL, VAN HALM VP, VOSKUYL AE, *et al.* Rheumatoid arthritis cardiovascular disease. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: S421–2.
- PINCUS T & CALLAHAN L. Taking mortality in rheumatoid arthritis seriously – predictive markers, socioeconomic status and comorbidity. *J Rheumatol*. 1986; 13: 841-5.
- PINHEIRO KV, HUNGRIA VT, FICKER ES, VALDUGA CJ, MESQUITA CH, MARANHÃO RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma and a preliminary study on the toxicity of etoposide associated with LDE. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006; 57(5): 624-30.
- PRASAD K, LEE P. Suppression of oxidative stress as a mechanism of reduction of hypercholesterolemic atherosclerosis by aspirin. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003; 8: 61-9.
- PREVOO ML, VAN'T HOF MA, KUPER HH, *et al.* Modified disease activity scores that include twenty-eight joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995; 38: 44–8.

- PRUZANSKI W, STEFANSKI E, DE BEER FC, *et al.* Comparative analysis of lipid composition of normal and acute-phase high density lipoproteins. *J of Lipid Res.* 2000; 41: 1035-47.
- PUK CG, BOCCHI EA, LO PRETE AC, FERREIRA SM, STOLF NA, MARANHÃO RC. Transfer of cholesterol and other lipids from a lipid nanoemulsion to high-density lipoprotein in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant.* 2009; 28(10): 1075-80.
- PYORALA K, DE BACKER G, GRAHAM I, *et al.* Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension. *Eur Heart J.* 1994; 15: 1300-31.
- RANTAPAA-DAHLQVIST S, WALLBERG-JONSSON S, DAHLEN G. Lipoprotein (a), lipids, and lipoproteins in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1991; 50: 366-8.
- RHO YH, SOLUS J, RAGGI P, OESER A, GEBRETSADIK T, SHINTANI A, STEIN CM. Macrophage activation and coronary atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011; 63(4): 535-41.
- RIZZO M, SPINAS GA, CESUR M, *et al.* Atherogenic lipoprotein phenotype and LDL size and subclasses in drug-naive patients with early rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis.* 2009; 207: 502-6.
- ROBINSON, K. & LOSCALZO, J. Other risk factors for coronary artery disease. TOPOL, E.J.: *Comprehensive Cardiovascular Medicine*, Philadelphia, Lippincott-Raven 1998, cap. 11: 245-51.

- ROMAN MJ, CROW MK, LOCKSHIN MD, *et al.* Rate and determinants of progress of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 3412-9.
- ROMAN MJ, MOELLER E, DAVIS A, *et al.* Preclinical carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 2006; 144: 249-56.
- ROSSNER S & LOFMARK C. Dyslipoproteinaemia in patients with active, chronic polyarthritis. A study on serum lipoproteins and triglyceride clearance (intravenous fat tolerance test). *Atherosclerosis.* 1977; 28: 41–52.
- RYE KA, BURSILL CA, LAMBERT G, *et al.* The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* 2009; 50: S195-S200.
- RYE KA, CLAY MA, BARTER PJ. Remodeling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis.* 1999; 145: 227-38.
- SANTOS RD, CHACRA AP, MORIKAWA A, *et al.* Plasma kinetics of free and esterified cholesterol in familial hypercholesterolemia: effects of simvastatin. *Lipids.* 2005; 40: 737-43.
- SANTOS RD, HUEB W, OLIVEIRA AA, *et al.* Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or without coronary artery disease. *J Lipid Res.* 2003; 44:464-9.
- SATTAR N, MCCAREY DW, CAPELL H, *et al.* Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2003; 108: 2957–63.

- SLATER HR, PACKARD CJ, SHEPERD J. Receptor-independent catabolism of low density lipoprotein. Involvement of the reticuloendothelial system. *J Biol Chem.* 1982; 257: 307-10.
- SMITH EM. Dose estimate techniques. In: *Nuclear medicine physics, instrumentation and agents.* - Mosby, 1977.
- SOLOMON DH, GREENBERG J, REED G, *et al.* Cardiovascular risk among patients with RA in CORRONA: comparing the explanatory value of traditional cardiovascular risk factors with RA risk factors. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67:482.
- SOLOMON DH, KARLSON EW, RIMM EB, *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2003; 107: 1303-7.
- SOWBY FD. Statement from the 1984 Stockholm meeting of the International Commission on Radiological Protection. *J Can Assoc Radiol.* 1985; 36: 56-7.
- STAMLER JS, VAUGHAN DE, RUDD MA, *et al.* Frequency of hypercholesterolemia after cardiac transplantation. *Am J Cardiol.* 1988; 62: 1268-72.
- STAMPFER MJ, SACKS FM, SALVINI S, *et al.* A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1991; 325: 373–81.
- STEINBERG D. Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J Intern Med.* 1993; 233: 227-32.

- STEINBERG D, PARTHASARATHY S, CAREW TE, *et al.* Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989; 320: 915-24.
- STEVENS RJ, DOUGLAS KM, SAEATZIS AN, *et al.* Inflammation and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Mol Med.* 2005; 7: 1-24.
- SVENSON KLG, LITHELL H, HALLGREN, *et al.* Serum lipoprotein in active rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory arthritides. I. Relativity to inflammatory activity. *Arch Intern Med.* 1987; 147: 1912-6.
- SYMMONS D, TURNER G, WEBB R, *et al.* The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology.* 2002; 41: 793-800.
- SZEKANECZ Z, KERÉKES G, DÉR H, *et al.* Accelerated atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1108: 349-58.
- TIAN L, XU Y, FU M, *et al.* The impact of plasma triglycerides and apolipoproteins concentrations on high-density lipoprotein subclasses distribution. *Lipids in Health and Disease.* 2011; 10-17.
- TOMS TE, SYMMONS DP, KITAS GD. Dyslipidaemia in rheumatoid arthritis: the role of inflammation, drugs, lifestyle and genetic factors. *Curr Vasc Pharmacol.* 2010; 8:301-26.
- VAN HALM VP, PETERS MJ, VOSKUYL AE, *et al.* Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease, a cross sectional study. The CARRE Investigation. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68: 1395-400.



- VAN LENTEN BJ, HAMA SY, DE BEER FC, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2758-67.
- VAN LENTEN BJ, WAGNER AC, NAYAK DP, et al. HDL loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection. *Circulation.* 2001; 103: 2283-8.
- VUILLEUMIER N, BRATT J, ALIZADEH R, et al. Anti-apoA-1 IgG and oxidized LDL are raised in rheumatoid arthritis (RA): potential associations with cardiovascular disease and RA disease activity. *Scan J Rheumatol.* 2010; 39: 447-53.
- WEINBLATT ME & KURITZKY L. RAPID: rheumatoid arthritis. *J Fam Pract.* 2007; 56: S1-7.
- WELCH, G. N. & LOSCALZO, J.: Homocysteine and atherothrombosis, *New Eng J Med.* 1998; 338: 1042-9.
- WHITE D, FAYEZ S, DOUBE A. Atherogenic lipid profiles in rheumatoid arthritis. *N Z Med J.* 2006; 119: U21-5.
- WOLFE F, FREUNDLICH B, STRAUS WL: Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2003; 30: 36-40.
- YOO WH: Dyslipoproteinemia in patients with active rheumatoid arthritis: effects of disease activity, sex and menopausal status on lipid profiles. *J Rheumatol.* 2004; 31: 1746-53.