



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA



Ana Carolina Boaventura de Carvalho

**OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE LUZ LASER (ELL) PARA  
ANÁLISE DO DIÂMETRO DA HDL EM AMOSTRAS DE MULHERES NO  
CLIMATÉRIO**

Ouro Preto

2020

Ana Carolina Boaventura de Carvalho

**OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE LUZ LASER (ELL) PARA  
ANÁLISE DO DIÂMETRO DA HDL EM AMOSTRAS DE MULHERES NO  
CLIMATÉRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angélica Alves Lima

Coorientador: Msc. Thiago Magalhães Gouvea

Ouro Preto

2020

## **SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO**

C331o Carvalho, Ana Carolina Boaventura de .

Otimização da técnica de Espalhamento de Luz Laser (ELL) para análise do diâmetro da HDL em amostras de mulheres no climatério. [manuscrito] / Ana Carolina Boaventura de Carvalho. - 2020. 40 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Alves Lima.

Coorientador: Me. Thiago Magalhães Gouvea.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Climatério. 2. Colesterol. 3. HDL-Colesterol. 4. Lipoproteínas HDL. I. Gouvea, Thiago Magalhães. II. Lima, Angélica Alves. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 618.175

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Ana Carolina Boaventura de Carvalho**

**Otimização da técnica de espalhamento de luz laser (ELL) para análise do diâmetro da HDL em amostras de mulheres no climatério**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 14 de dezembro de 2020

### Membros da banca

Profa. Dra. Angélica Alves Lima - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)  
MSc. Thiago Magalhães Gouvea - Co-orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Prof. Dr. Elísio Alberto Evangelista - (Universidade Federal de Ouro Preto)  
Dra. Nayara Nascimento Toledo Silva - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Angélica Alves Lima, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 16/12/2020



Documento assinado eletronicamente por **Angélica Alves Lima, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 16/12/2020, às 23:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0116576** e o código CRC **7BF1BDF5**.

*A Jesus Cristo, luz do mundo.*

*Meu único e suficiente salvador.*

## AGRADECIMENTOS

*A minha mãe, Silvânia Boaventura de Carvalho, pelos sacrifícios realizados para que eu pudesse ter a chance de estudar.*

*Ao meu pai e irmã, Sérgio Murilo de Carvalho e Hélen Márcia Boaventura de Carvalho por todo apoio.*

*Ao Dieferson, por sua calma, paz, incentivo e cuidado. Um porto seguro.*

*A todos os meus professores do ensino básico e médio por seu empenho e dedicação.*

*A minha amada avó, Professora Bernadina de Queiroz Carvalho e minha tia, Professora Geralda de Carvalho por serem meu primeiro exemplo acadêmico em família.*

*A todos os meus professores da universidade pela dedicação e conhecimento compartilhados.*

*A minha Orientadora, Prof. Dr.<sup>a</sup> Angélica Alves Lima e ao Coorientador Thiago Magalhães Gouvea, pela paciência, conhecimento compartilhado e empenho em tornar esse projeto possível.*

*Ao Laboratório de Análises Clínicas (LAPAC) e o Laboratório Multiusuário do CiPharma, Escola de Farmácia, pelo apoio e liberação dos equipamentos utilizados para a análise do perfil lipídico e do diâmetro da HDL.*

## RESUMO

A associação entre o climatério e o aumento do risco cardiovascular já está bem estabelecida sendo, em parte, atribuída a alterações desfavoráveis no perfil lipídico, principalmente, a diminuição da concentração da lipoproteína de alta densidade (HDL) e o aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL). A HDL atua no transporte reverso do colesterol (TRC), removendo o excesso de colesterol das células e tecidos periféricos para o fígado, desempenhando uma função ateroprotetora. Estudos mostraram a existência de subfrações da HDL que diferem no tamanho e estrutura. Além disso, também já foi demonstrado que as propriedades cardioprotetoras da HDL estão associadas com o tamanho da lipoproteína. Assim, é importante a padronização e otimização de métodos laboratoriais que permitam o isolamento e a determinação das subfrações da HDL permitindo melhor avaliação do risco cardiovascular. Este trabalho teve como objetivo otimizar a técnica de Espalhamento de Luz Laser (ELL) para a determinação do diâmetro da HDL em amostras de mulheres no climatério. Foram avaliadas amostras de 10 mulheres, na faixa etária de 40 a 65 anos. Após a coleta de sangue em tubo com EDTA e a separação do plasma, procedeu-se a precipitação química com polietilenoglicol (PEG) 8.000. Em seguida, o sobrenadante contendo HDL foi filtrado, de duas formas distintas: utilizando o filtro de membrana 0,22 $\mu$ m ou o filtro de papel quantitativo 1-2 $\mu$ m. O filtrado foi analisado pela técnica de ELL para a determinação do diâmetro da HDL. Também foi realizada a dosagem de HDL, colesterol total (CT) e triglicérides (TG) e calculada a concentração de LDL e de não-HDL. Não foi observada diferença significativa em relação ao diâmetro da HDL (9,66 $\pm$ 0,28nm vs 10,63 $\pm$ 3,49nm; p=0,413) e ao índice de polidispersão (0,24 $\pm$ 0,01 vs 0,29 $\pm$ 0,07; p=0,083) quando se utilizou os diferentes filtros, embora o desvio padrão em ambas as medidas tenha sido maior em amostras separadas com o filtro de papel. Também não foi encontrada associação significativa entre o diâmetro da HDL e a concentração dos analitos do perfil lipídico. Foi observada relação direta entre os níveis plasmáticos de HDL e o diâmetro da HDL. A otimização da técnica de ELL usando o filtro de papel não se mostrou eficiente, enquanto o filtro de membrana forneceu resultados coerentes para o diâmetro da partícula de HDL.

**Palavras chaves:** subfrações de HDL, HDL2, HDL3, Espalhamento de Luz Laser (ELL), Climatério.

## ABSTRACT

The association between climacteric and increase in cardiovascular risk is already evaluated, in part, attributed to unfavorable changes in lipid profile, mainly decrease in concentration of high-density lipoprotein (HDL) and increase in low lipoprotein density (LDL). HDL acts in reverse cholesterol transport (RCT), removing excess cholesterol from peripheral cells and tissues, performing an atheroprotective function. Studies showed the existence of HDL subfractions that differ in size and structure. In addition, it has also been added that the cardioprotective properties of HDL are associated with size of the lipoprotein. Thus, it is important to standardize and optimize laboratory methods that follow isolation and a determination of HDL subfractions, allowing a better assessment of cardiovascular risk. This work aimed to optimize the Laser Light Scattering (LLS) technique for determining the HDL diameter in climacteric women. Ten women, aged from 40 to 65 years, were evaluated. Blood samples were collected in tubes with EDTA and plasma was obtained, chemical separation was performed with polyethylene glycol (PEG) 8.000. Then, HDL-containing supernatant was filtered in two different ways: using the 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter or the 1-2  $\mu\text{m}$  quantitative paper filter. The filtrate was analyzed using the LLS technique to determine HDL diameter. HDL, total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were also measured, and the concentration of LDL and non-HDL was determined. No difference was mentioned in relation to HDL diameter ( $9.66 \pm 0.28\text{nm}$  vs  $10.63 \pm 3.49\text{nm}$ ;  $p = 0.413$ ) and polydispersity index ( $0.24 \pm 0.01$  vs  $0.29 \pm 0.07$ ;  $p = 0.083$ ) when using different filters, although the standard deviation in both measures was greater, particularly with paper filter. There was also no association between diameter of HDL and concentration of analytes in lipid profile. There was a direct relationship between plasma HDL levels and HDL diameter. It is concluded that LLS technique and the membrane filter provided coherent results for HDL particle diameter.

**Keywords:** HDL subfractions, HDL2, HDL3, Laser Light Scattering (LLS), Climacteric.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo da HDL .....	16
Figura 2 – Representação das subfrações de HDL, sua faixa média de densidade e diâmetro...	17
Figura 3 – Delineamento do estudo .....	23
Figura 4 – Aparelho <i>Zetasizer Nano ZS</i> (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) utilizado para a determinação do diâmetro das partículas de HDL pela técnica de Espalhamento de Luz Laser (ELL) .....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Idade e perfil lipídico das participantes do estudo (n=10) .....	27
Tabela 2 - Diâmetro da HDL (nm) e índice de polidispersão determinados pela técnica ELL, em amostras precipitadas por PEG 8.000 e filtradas com diferentes filtros (n=10) .....	28
Tabela 3 - Associação entre os analitos do perfil lipídico e o diâmetro das partículas de HDL avaliadas com ELL em amostras processadas utilizando diferentes filtros .....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1 – *ATP-binding cassette subfamily A member 1* (Subfamília A1 da cassete de ligação ao ATP).

ABCG1 – *ATP-binding cassette subfamily G member 1* (Subfamília G1 da cassete de ligação ao ATP).

Apo – Apolipoproteína.

AVC – Acidente vascular cerebral.

CT – Colesterol total.

CL – Colesterol livre.

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio.

DCV – Doença cardiovascular.

EC – Éster de colesterol.

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético).

FL – Fosfolipídeos.

HDL – Lipoproteína de alta densidade.

HDLc – Colesterol HDL.

ELL – Espalhamento de luz laser.

LCAT – *lecithin-cholesterol acyltransferase* (Lecitina-colesterol aciltransferase).

LDL – Lipoproteína de baixa densidade.

LH – Lipase hepática.

LAPAC – Laboratório de análises clínicas.

LDLc – Colesterol LDL.

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio.

MnCl<sub>2</sub> – Cloreto de manganês.

NBS – *Non-Invasive Back-Scatter* (Retrodispersão não invasiva).

PEG – Polietilenoglicol.

CETP – *cholesteryl ester transfer protein* (Proteína de transferência de éster de colesterol).

RMN – Ressonância magnética nuclear.

SR-B1 – *scavenger receptor class B type I* (Receptor sequestrador classe B tipo 1).

TRC – Transporte reverso do colesterol.

TG – Triglicérides.

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto.

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa.

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	<b>12</b>
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>14</b>
2.1 Geral .....	14
2.2 Específicos .....	14
<b>3 Revisão de Literatura</b> .....	<b>15</b>
3.1 Lipoproteína de alta densidade (HDL) .....	15
3.2 Subfrações de HDL e doença cardiovascular .....	16
3.3 Métodos para separação e determinação da HDL .....	19
3.4 Determinação do diâmetro da HDL por Espalhamento de Luz Laser (ELL) .....	20
3.5 Climatério: DCV e diâmetro da HDL .....	21
<b>4 Métodos</b> .....	<b>23</b>
4.1 Delineamento do estudo .....	23
4.2 Coleta e preparo das amostras .....	24
4.3 Precipitação e separação da HDL .....	24
4.4 Determinação do diâmetro da HDL .....	25
4.5 Avaliação do perfil lipídico .....	26
4.6 Análise estatística .....	26
<b>5 Resultados e Discussão</b> .....	<b>27</b>
5.1 Teste dos filtros na técnica de ELL para determinação do diâmetro da HDL .....	27
5.2 Associação da concentração dos analitos do perfil lipídico com o diâmetro da HDL determinado utilizando diferentes filtros na técnica de ELL .....	29
<b>6 Conclusão</b> .....	<b>32</b>
<b>7 Referências</b> .....	<b>33</b>

## 1. Introdução

O climatério é uma fase da vida da mulher na faixa etária de 40 aos 65 anos, que compreende a transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo (HARLOW *et al.*, 2012). Durante o climatério, os ciclos menstruais se tornam irregulares, até cessarem completamente em decorrência do hipoestrogenismo. A menopausa é um marco dessa fase, correspondendo ao último ciclo menstrual, diagnosticada retrospectivamente após 12 meses de amenorrea, e acontece geralmente em torno dos 50 anos de idade (BRASIL, 2008).

Esta fase é marcada por transformações biológicas e fisiológicas, com o surgimento de diversos sintomas de curto e longo prazo, como mudanças no humor, insônia, irritabilidade, ansiedade, distúrbios vasomotores e urogenitais (HARLOW *et al.*, 2012). Junto a esses sintomas, se destacam os distúrbios do metabolismo lipídico como aumento dos níveis de CT, TG e lipoproteína de baixa densidade (LDL), assim como a diminuição da HDL que favorecem o aumento do risco cardiovascular (MASSON *et al.*, 2019). Esses sintomas indicam que este é um período de importantes mudanças, que impactam significativamente na saúde e na qualidade de vida da mulher.

A associação entre o hipoestrogenismo e o aumento do risco cardiovascular (RCV) já está bem estabelecida e este risco pode ser, em parte, atribuído a alterações desfavoráveis no perfil lipídico ou lipoprotéico (CHAE; DERBY, 2011; COLLINS *et al.*, 2016). No climatério, a dislipidemia é caracterizada, principalmente, pelo aumento nos níveis da LDL e diminuição da HDL (DERBY, 2009; CHOI *et al.*, 2015).

HDL é uma partícula heterogênea, composta por um núcleo lipídico hidrofóbico contendo ésteres de colesterol (EC) e pequena proporção de TG, circundado por uma camada monofásica de fosfolípides (FL), colesterol livre (CL) e apolipoproteínas (RIZZO *et al.*, 2014). O metabolismo da HDL determina a sua composição, forma, tamanho e carga de superfície, sendo responsável pela heterogeneidade desta lipoproteína. As diferenças no tamanho da HDL podem estar associadas ao número de moléculas de apolipoproteínas na superfície e a concentração do colesterol esterificado no núcleo da lipoproteína (SKINNER, 1994; BARTER *et al.*, 2003; FAZIO; PAMIR, 2016).

Já foram descritas subfrações da HDL com tamanhos e estrutura diversos (RIZZO *et al.*, 2014), sugerindo características e funções distintas (CAMONT; CHAPMAN; KONTUSH, 2011). Alguns estudos realizados demonstraram a importância da determinação do tamanho da HDL ao observar uma relação positiva entre o menor diâmetro das partículas desta lipoproteína e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) (VERIK, 2007; ASZTALOS,

2008; PIRILLO *et al.*, 2012; SUPERKO *et al.*, 2012), inclusive em mulheres no climatério (LAMON-FAVA, 2008; EL KHOUDARY *et al.*, 2016).

A concentração da lipoproteína HDL é comumente determinada por métodos enzimáticos colorimétricos já padronizados e largamente utilizados na rotina dos laboratórios de análises clínicas e na pesquisa científica (FALUDI *et al.*, 2017). Embora a literatura científica seja consistente em mostrar uma correlação inversa entre os níveis plasmáticos de HDL e o RCV, evidências sugerem que o papel antiaterogênico do HDL não é simplesmente definido por seu nível plasmático (PIRILLO *et al.*, 2012). Daí a importância de entender melhor os aspectos do metabolismo da HDL já que a determinação apenas da concentração plasmática dessa lipoproteína seria insuficiente para avaliar seu papel protetor (VON ECKARDSTEIN *et al.*, 2001). Assim, além da medição de sua concentração, a avaliação do perfil de distribuição e funcionalidade das subfrações de HDL pode representar a melhor abordagem para investigar a relação entre HDL e DCV e melhorar a predição do RCV (PIRILLO *et al.*, 2012).

As propriedades físico-químicas das lipoproteínas, incluindo densidade, mobilidade, tamanho e conteúdo de apolipoproteína são características que permitem que várias subfrações de HDL sejam separadas e diferenciadas por diferentes técnicas e métodos como precipitação química, ultracentrifugação sequencial, eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida não desnaturante, imunoafinidade e ressonância magnética nuclear (RIZZO *et al.*, 2014). No entanto, a maioria destas metodologias é de alto custo e complexa (GUO, 2012). A técnica de ELL tem sido usada na medição do tamanho da LDL após a separação desta lipoproteína por ultracentrifugação, sendo esta proposta metodológica adaptada e padronizada por Lima e Maranhão (2004) para a determinação do tamanho da HDL. Nesta adaptação, para a separação da HDL, a ultracentrifugação foi substituída pela precipitação das lipoproteínas contendo apo B com PEG 8000, seguida por filtração utilizando filtro de membrana 0,22 $\mu$ m e posterior dimensionamento das partículas de HDL. O método de ELL é rápido, prático e poderia ser adaptável à rotina laboratorial. Estudos voltados para a otimização desta técnica no sentido de redução de custo poderiam aumentar ainda mais a acessibilidade para a sua utilização na rotina laboratorial e proporcionar melhor avaliação de condições onde há maior risco cardiovascular, como no período do climatério.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Geral**

Otimizar a técnica de Espalhamento de Luz Laser (ELL) para a determinação do diâmetro da HDL em amostras de mulheres no climatério.

### **2.2. Específicos**

Comparar a eficiência dos filtros de membrana 0,22 $\mu$ m e de papel quantitativo 1-2 $\mu$ m para a separação das partículas de HDL;

Avaliar a associação das concentrações dos analitos do perfil lipídico com o diâmetro da HDL obtido pela técnica de ELL utilizando diferentes filtros para a separação da lipoproteína em amostras de mulheres climatéricas.

### 3. Revisão de Literatura

#### 3.1. Lipoproteína de alta densidade (HDL)

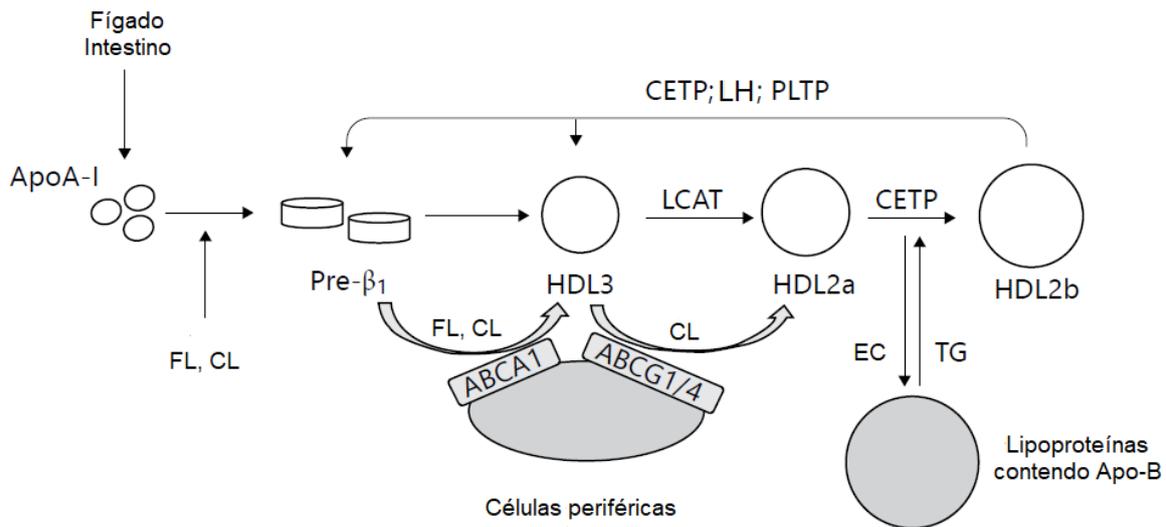
A HDL é uma lipoproteína sintetizada no fígado e no intestino. Representa um grupo de partículas heterogêneas, com um núcleo hidrofóbico contendo principalmente ésteres de colesterol (EC) e TG, envolto por uma monocamada anfipática de fosfolipídios (FL), colesterol livre (CL) e proteínas denominadas de apolipoproteínas (apo) (PHILLIPS, 2014). A HDL varia em seu conteúdo lipídico e de apolipoproteínas (apoA-I 60%; apoA-II 20% e apolipoproteínas C, D, E e J em menores quantidades). Estas proteínas compõem a camada externa da HDL que são descritas como de alta densidade em decorrência da maior proporção de apolipoproteínas em relação aos lipídios. Dessa forma, são partículas menores e conseqüentemente mais densas, tendo sua densidade entre 1,06 – 1,21 g/mL (YUANA *et al.*, 2014) e diâmetro entre 5 – 12 nm (RIZZO *et al.*, 2014).

A HDL é comumente utilizada como um dos indicadores do RCV. É antiaterogênica devido, em parte, à sua principal função, que é o TRC, ou seja, a remoção do excesso de colesterol para o fígado. A HDL possui atividades anti-inflamatória e antioxidante (NOTO, 2009). São descritas ainda, evidências de atividade antitrombótica, citoprotetora, vasodilatadora e anti-infecciosa (RIZZO *et al.*, 2014). Por estas funções é conhecida como “bom colesterol”.

O metabolismo da HDL é um processo complexo que envolve diversas enzimas, transportadores e apolipoproteínas, como apoA-I, *ATP-binding cassette subfamily A member 1* (ABCA1) e o *scavenger receptor class B type I* (receptor hepático SR-B1) (NOTO, 2009; GUO, 2012). A Figura 1, demonstra esse processo.

A síntese da HDL no fígado e no intestino inicia com a secreção da apoA-I que se une a FL e a CL não esterificado, formando as partículas pré- $\beta_1$  discoides (KARATHANASIS, 2017). As pré- $\beta_1$ , são partículas muito pequenas, que se infiltram facilmente entre as células e recrutam grande quantidade de CL e FL, formando a HDL-3. A transferência dos FL e CL não esterificado para pré- $\beta_1$ , tornando-a em HDL-3 ocorre por meio da atividade da ABCA1) e *ATP-binding cassette subfamily G member 1* (ABCG1) (LUND-KATZ; PHILLIPS, 2010).

Figura 1 – Metabolismo da HDL.



ApoA-I: apolipoproteína AI; FL: fosfolipídios; CL: colesterol livre; Pré-β1: lipoproteína discoide pré-β1; ABCA1: *ATP-binding cassette subfamily A member 1*; ABCG1: *ATP-binding cassette subfamily G member 1*; LCAT: *lecithin-cholesterol acyltransferase*; CETP: *cholesterol ester transfer protein*; EC: éster de colesterol; TG: triglicerídeos; Apo-B: apolipoproteína-B; LH: lipase hepática; PLTP: *phospholipids transfer protein*.

Fonte: PIRILLO *et al.*, 2013, v. 124, p. 118.

Subseqüencialmente, a enzima *lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT) esterifica o CL em EC, que devido ao fato de serem hidrofóbicos, são direcionados para o interior da lipoproteína, que passa a ser denominada HDL-2a esférica e maior (FRANCIS, 2010). Segundo Superko e colaboradores (2012), a HDL-2 é aproximadamente 50% maior e tem cerca de três a quatro vezes mais conteúdo de EC em relação a HDL-3.

A *cholesterol ester transfer protein* (CETP), em seguida, realiza a troca do colesterol esterificado da HDL por TG presentes nas lipoproteínas contendo apo-B, como a LDL e a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), diminuindo o conteúdo de EC presente na HDL e aumentando o aporte de TG. A lipase hepática (HL) hidrolisa os triglicerídeos presentes no interior da HDL gerando partículas menores (PIRILLO; NORATA; CATAPANO, 2013). Dessa forma, as novas partículas de HDL geradas com menor conteúdo de colesterol podem reiniciar seu ciclo metabólico atuando na remoção de lipídeos dos vasos e tecidos periféricos.

### 3.2. Subfrações de HDL e doença cardiovascular

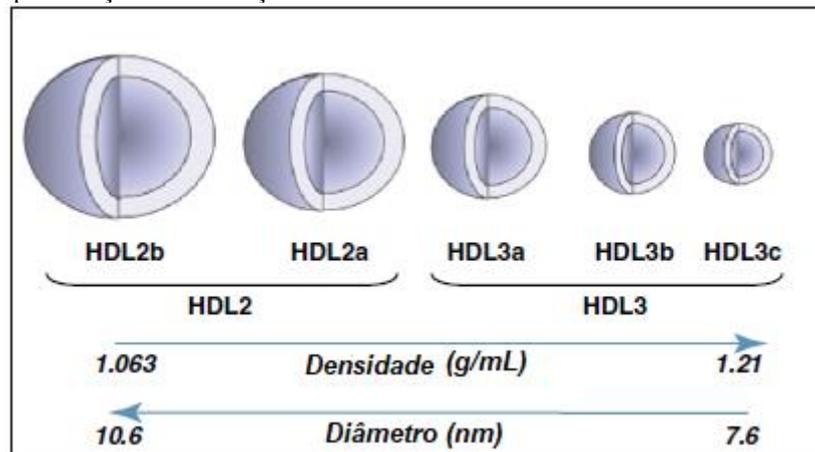
A remodelação da HDL, que ocorre durante seu metabolismo, confere a essa lipoproteína, diferentes diâmetros, densidades, composições proteica e lipídica, e

consequentemente, diferentes funções. A heterogeneidade das subfrações da HDL se deve às mudanças estruturais pelas quais essas lipoproteínas passam no seu metabolismo (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Blanche e colaboradores (1981) identificaram e separaram distintas subclasses de HDL através da determinação do diâmetro desta lipoproteína, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida. Sua caracterização encontrou duas subclasses da HDL-2 (HDL-2a e HDL-2b) e três subclasses de HDL-3 (HDL-3a, HDL-3b e HDL-3c). Pirillo e colaboradores (2013) também separaram as partículas de HDL por eletroforese bidimensional em pré- $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_4$ ), partículas- $\alpha$  ( $\alpha_4$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$ ) e pré- $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_4$ ). Na literatura, outros trabalhos utilizando diferentes metodologias conseguiram caracterizar diversas subfrações da HDL por tamanho, forma, estrutura e composição de apolipoproteínas sugerindo que as diversas partículas possam possuir diferentes funções no metabolismo lipídico, no transporte reverso do colesterol e consequentemente, na saúde cardiovascular (CHEUNG; ALBERS, 1982; ASZTALOS *et al.*, 1993; ROSENSON *et al.*, 2011).

A Figura 2 exemplifica o tamanho das subfrações de HDL-2 e HDL-3 assim como a densidade e o diâmetro das partículas que variam de 1,063 a 1,21 g/mL e 10,6 a 7,6 nm, respectivamente.

**Figura 2** – Representação das subfrações de HDL sua faixa média de densidade e diâmetro.



Fonte: adaptado de Rye *et al.* (2009).

Em trabalhos científicos sobre DCV como a aterosclerose, doenças coronarianas e infarto agudo do miocárdio, são observadas variações nos níveis das diferentes subfrações de HDL, sugerindo que aquelas de maior tamanho (HDL-2a e HDL-2b) são inversamente relacionadas com o RCV. Por outro lado, a HDL menor e mais densa (HDL-3a, HDL-3b e HDL-3c) está diretamente relacionada com o RCV (CAMONT; CHAPMAN; KONTUSH,

2011). Portanto, a avaliação dessas subfrações podem fornecer resultados mais realísticos e assertivos quanto a saúde cardiovascular do que a simples medida das concentrações séricas ou plasmáticas da HDL (PIRILLO *et al.*, 2013).

Anderson e colaboradores (1978) observaram que os níveis de HDL-3 (menor tamanho) eram negativamente relacionados com os níveis plasmáticos da HDL-2b. Ademais, os níveis de HDL-2b e HDL-2a (maior tamanho) demonstraram relação positiva entre si, assim como tinham aumento progressivo em suas concentrações à medida que aumentavam as concentrações de HDL total. Portanto, foi sugerido novamente, que as subfrações de HDL de maior diâmetro (HDL-2b e HDL-2a) podem ser as partículas desse complexo grupo de lipoproteínas a desenvolverem atividade ateroprotetora, levando a um menor risco de desenvolvimento de DCV. Drexel e colaboradores (1992) também relataram em seu trabalho que pacientes com doença arterial coronariana apresentavam menores níveis sanguíneos da subfração HDL-2b, demonstrando mais uma vez a correlação inversa dos níveis da HDL de maior tamanho com o RCV.

Outros trabalhos também relatam relação inversa entre o risco de DCV e a diminuição da HDL maior e aumento da HDL menor. Segundo Yang e colaboradores (2005), na dislipidemia aparentemente ocorre mudança no perfil lipídico, ocasionando diminuição nos níveis da HDL-2b e aumento das partículas pequenas como pré- $\beta_1$ . Ainda de acordo com a literatura, HDL de menores diâmetros são observadas em pessoas portadoras de síndrome metabólica (LAGOS *et al.*, 2009), obesidade (TIAN *et al.*, 2011), no infarto do miocárdio (GUEY *et al.*, 2011), em mulheres com DCV (BLACKBURN *et al.*, 2012), e diabetes (TIAN *et al.*, 2012).

Ainda são poucos os trabalhos que investigaram a associação entre as subfrações da HDL e o desenvolvimento do risco cardiovascular em mulheres no período de climatério. Segundo Lamon-Fava e colaboradores (2008), essa associação é pouco caracterizada nessa população. O autor utilizou a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e avaliou 256 mulheres na pós-menopausa com doença arterial coronariana e 126 mulheres na pós-menopausa sem doença arterial estabelecida e observou que as mulheres que possuíam doença coronariana estabelecida apresentaram maior níveis plasmáticos da subfração pré- $\beta_1$  que são lipoproteínas muito pequenas, ao passo que as voluntárias sem doença coronariana apresentaram maiores níveis plasmáticos de  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  que são partículas grandes.

Stevenson e colaboradores (1993) avaliaram 542 mulheres sadias na pré e pós-menopausa e verificaram que grande parte das mulheres na pós-menopausa apresentavam maiores concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL e HDL-3, enquanto os níveis de

HDL total e HDL-2 eram menores. Essas observações mostraram que o climatério determina variações no perfil lipídico da mulher e também evidenciaram que a subfração de HDL de maior tamanho (HDL-2) está relacionada ao menor risco cardiovascular, enquanto a de menor tamanho (HDL-3) está associada ao maior risco cardiovascular.

Li e colaboradores (1996) também avaliaram mulheres na pré-menopausa e pós-menopausa e verificaram que as mulheres em pós-menopausa tinham menores níveis de HDL quando comparadas às na pré-menopausa, e ainda observaram que esses níveis plasmáticos eram acompanhados de menores níveis de HDL-2 e maiores de HDL-3, demonstrando que mulheres na pós-menopausa possuem maior tendência ao aumento do RCV. Já Cheung e colaboradores (1999) chegaram à conclusão que o risco de DCV está mais relacionada a distribuição das subfrações de HDL do que a redução de seus níveis séricos.

Por essa razão, é sugestivo em muitos trabalhos que, além da medida das concentrações séricas ou plasmáticas totais de HDL, a avaliação de suas subfrações e funções podem representar uma alternativa promissora na predição do risco de DCV.

### **3.3. Métodos para separação e determinação da HDL**

Rotineiramente, a concentração total da HDL é determinada nos laboratórios clínicos utilizando o método de precipitação ou o homogêneo direto (SCHECTMAN; SASSE, 1993). O primeiro, se baseia na precipitação quantitativa de LDL e VLDL, deixando apenas a HDL no sobrenadante (BAIRAKTARI *et al.*, 1999). Os precipitantes podem ser poliânions (heparina, sulfato de dextrano e o fosfotungstato) e cátions bivalentes ( $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$  e  $CaCl_2$ ) (PENTTILÃ *et al.*, 1981; HUBBARD *et al.*, 1998; OKADA *et al.*, 2011). O PEG, um polímero neutro e de alto peso molecular, também vem sendo utilizado como precipitante para a separação da HDL no soro e plasma humanos (ALLEN *et al.*, 1979; LIMA; MARANHÃO, 2004; LUDWIG *et al.*, 2018). Estes precipitantes atuam diminuindo a solubilidade das lipoproteínas que contém apo B (LDL e VLDL) levando à sua precipitação (SILVA *et al.*, 2019). Ao contrário dos precipitantes carregados eletricamente, o PEG tem a vantagem de não possuir carga e, portanto, não interferir nas reações enzimáticas dos conjuntos diagnósticos de determinação das lipoproteínas e nem na atividade do EDTA (ALLEN *et al.*, 1979).

O uso de PEG 8.000 como precipitante também permitiu a análise das subfrações da HDL presentes no soro ou plasma (MARTINHÃO *et al.*, 2012).

Vários métodos tem sido desenvolvidos para a determinação das subfrações da HDL, visando a melhoria na triagem do risco de doença cardiovascular (BAIRAKTARI *et al.*, 1999;

CORDOVA *et al.*, 2004). Estes métodos são capazes de distinguir as subfrações de acordo com densidade, mobilidade, composição de lipoproteínas e diâmetro da partícula. Algumas técnicas utilizadas são ultracentrifugação sequencial (CHAPMAN *et al.*, 1981), eletroforese em gel de gradiente não desnaturante (BLANCHE *et al.*, 1981), imunoafinidade (CHEUNG; ALBERS, 1982), eletroforese bidimensional (ASZTALOS *et al.*, 1993; CAMONT; CHAPMAN; KONTUSH, 2011), mobilidade iônica (MUSURUNU *et al.*, 2009; ROSENSON *et al.*, 2011), sistema *lipoprint* (KUCERA *et al.*, 2013; ORAVEC *et al.*, 2014) e ressonância magnética nuclear (RMN) (JEYARAJAH *et al.*, 2006; RIZZO *et al.*, 2014).

Contudo, estas técnicas são, geralmente, de alto custo e morosas, sendo de difícil aplicabilidade na rotina dos laboratórios clínicos. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de novas metodologias ou a otimização das já existentes de forma a atender as peculiaridades da rotina clínica (SILVA *et al.*, 2019).

#### **3.4. Determinação do diâmetro da HDL por Espalhamento de Luz Laser (ELL)**

A técnica de ELL, do inglês *Laser-Light Scattering*, tem sido utilizada por ser um método que permite a análise do diâmetro da HDL por dispersão da luz através da difração de um laser, sendo considerada de moderado custo, rápida e de fácil aplicação, além de fornecer resultados semelhantes aos obtidos por ressonância magnética nuclear e eletroforese em gel (MARTINHÃO *et al.*, 2012).

Os métodos mais utilizados para a determinação da medida do diâmetro das partículas de HDL são a ressonância magnética nuclear e as eletroforeses de maior resolução, contudo essas técnicas têm seu uso limitado quase que exclusivamente a protocolos de pesquisa científica, por serem equipamentos caros e de complexa execução, sendo de difícil adaptação à rotina de laboratórios de análises clínicas (FALUDI *et al.*, 2017).

Na tentativa de suprir essa necessidade, Lima e Maranhão (2004) padronizaram uma técnica para o dimensionamento das subfrações de HDL. Para isso, utilizaram a precipitação química por meio do PEG 8.000 e a mensuração do diâmetro das partículas de HDL por meio da técnica de ELL, onde obtiveram uma média de diâmetros igual à 8,8 nm, sendo consistente com os valores descritos na literatura e concluíram que a técnica seria de fácil execução e aplicabilidade na rotina clínica, além de consumir menos tempo na análise das amostras.

Na literatura são encontrados alguns trabalhos que utilizaram esta técnica para medição do tamanho de partícula de HDL, em condições semelhantes. Todos eles obtiveram resultados

reprodutíveis e condizentes com a literatura, sendo descrito uma faixa entre 7,3 a 14 nm (VERIC *et al.*, 2007; ROSENSON *et al.*, 2011).

Teixeira e colaboradores (2019) utilizaram a técnica de ELL para medir o diâmetro da partícula de HDL em pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio e pacientes sem confirmação de infarto. Após precipitação por PEG 8.000 e filtração em membrana 0,22 $\mu$ m, obtiveram diâmetros iguais a  $10,94 \pm 0,23$  nm e  $13,59 \pm 0,4$  nm, respectivamente.

De forma semelhante, Parra e colaboradores (2014), encontraram diâmetros entre 7,57 e 8,22 nm e descreveram associação positiva com o risco de DCV. Já Martinhão e colaboradores (2012) padronizaram a técnica de ELL para determinar o diâmetro da HDL após precipitação com PEG em amostras de plasma ou soro de pacientes saudáveis, e obtiveram resultados entre 8,43 e 8,49 nm.

### **3.5. Climatério: DCV e diâmetro da HDL**

O climatério é caracterizado por diversas mudanças fisiológicas que possuem considerável impacto na vida da mulher e são decorrentes do hipoestrogenismo (HARLOW *et al.*, 2012). A redução progressiva dos níveis de estrogênio pode levar a alterações menstruais, sintomas vasomotores (ondas de calor, sudorese noturna), insônia, depressão, irritabilidade, mudanças no estado de humor, perda de concentração e memória, sintomas geniturinários (ressecamento vaginal, diminuição da libido, urgência e incontinência urinária, dispareunia), cefaleia, vertigem, palpitações, atrofia de pele e mucosas, prurido, ganho de peso, além de mudanças ósseas e cardiovasculares (BACHMANN, 2001; DE LORENZI *et al.*, 2005). Portanto, na fase pós-menopausa pode ocorrer aumento do risco para doenças cardiovasculares (DCV), osteoporose, dislipidemias, hipertensão arterial, *diabetes mellitus* (DM) e obesidade abdominal (ESHRE, 2011).

Juntamente com o tabagismo e a hipertensão, a dislipidemia é considerada como um dos três fatores de risco responsáveis por aproximadamente 75% das doenças cardiovasculares (BERTOLIN *et al.*, 2019). Estudos mostram que o climatério está associado a um perfil pró-aterogênico de lipoproteínas, com aumento dos níveis de LDL, principalmente LDL pequena e densa; além da diminuição da concentração de HDL, principalmente da subfração de HDL-2 e do aumento dos níveis de triglicerídeos (CAMPOS *et al.*, 1988; STEVENSON; CROOK E GODSLAND, 1993; LI *et al.*, 1996; MATTHEWS *et al.*, 2009; ANAGNOSTIS *et al.*, 2015; FONSECA; SILVA; FERREIRA, 2017). Este período está associado a um aumento de

aproximadamente três a sete vezes no risco de DCV, sendo responsável pela maior causa de morte em mulheres após a transição menopausal (FALUDI *et al.*, 2017).

A HDL é notadamente conhecida por sua ação cardioprotetora. Contudo, mudanças nos níveis de hormônios sexuais, acúmulo de gordura e alterações no perfil lipídico, são características presentes em mulheres de meia idade que podem contribuir para a diminuição da atividade cardioprotetora da HDL (EL KHOUDARY, 2017).

Alguns trabalhos científicos já mostraram que mulheres de meia idade com altos níveis de HDL total apresentaram maior risco ao desenvolvimento de acidente vascular cerebral (AVC) não fatal e aterosclerose nas artérias carótidas, demonstrando que a HDL não apresentou um papel de proteção para a saúde cardiovascular (BOTS *et al.*, 2002; FAN; DWYER, 2007). El Khoudary e colaboradores (2016) também observaram que o aumento nas concentrações de HDL total estava associado positivamente ao desenvolvimento de maior espessura da camada íntima da carótida. Dessa forma, esses resultados apontaram para a importância de se estudar e quantificar as subfrações da HDL e não apenas seus níveis séricos ou plasmáticos (EL KHOUDARY *et al.*, 2018).

Segundo Freedman e colaboradores (1998), as partículas de HDL de maior diâmetro possuem maior relação com a ação cardioprotetora do que as HDL de menor diâmetro. Musunuru e colaboradores (2009), isolando as subfrações de HDL pelo método de mobilidade iônica, observaram que as subfrações de maior diâmetro (HDL-2b) se correlacionavam inversamente com o RCV e o desenvolvimento de aterosclerose na carótida. Já a subfração HDL-3b estava relacionada com o aumento do RCV (WILLIAMS *et al.*, 1992).

Alagona e colaboradores (2002) em estudo com 89 indivíduos assintomáticos utilizando a precipitação por ultracentrifugação observaram que as frações de HDL-2 e HDL-3 eram inversamente correlacionadas com o aumento da camada íntima da carótida. Já Lamoufava e colaboradores (2008) através da técnica de eletroforese em gel bidimensional, separaram as partículas de HDL  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2 e  $\alpha$ -3 com os diâmetros 11,2 nm, 9,51 nm e 7,12 nm, respectivamente, e observaram que a concentração da fração  $\alpha$ -2 (9,51 nm) se relacionava de forma negativa com a progressão da aterosclerose em mulheres na pós menopausa.

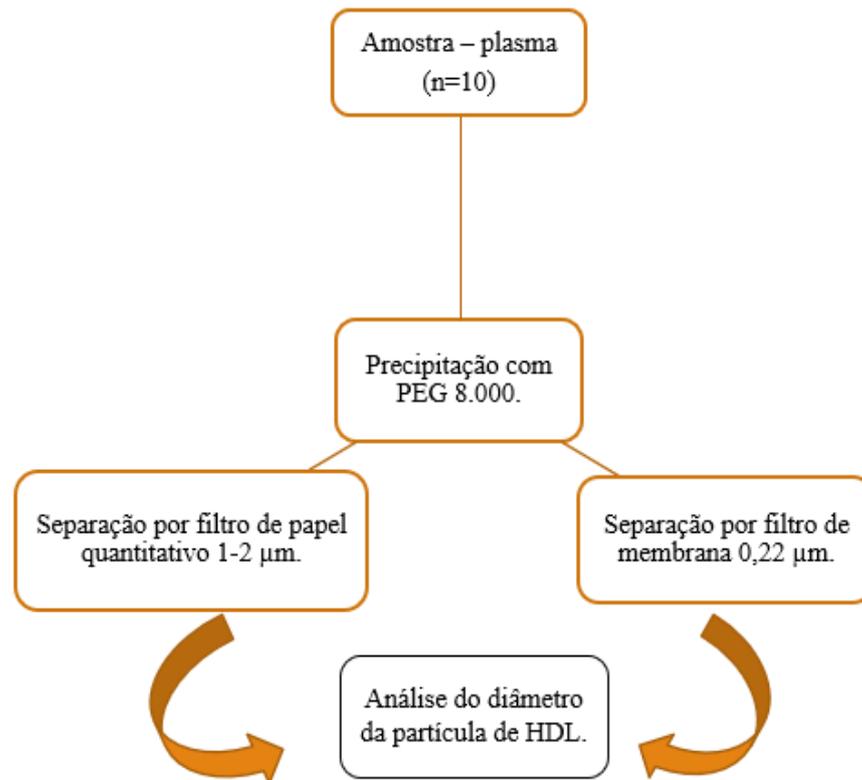
## 4. Métodos

### 4.1. Delineamento do estudo

Este trabalho foi realizado com amostras de 10 mulheres, usuárias do Laboratório de Análises Clínicas da Escola de Farmácia (LAPAC), na faixa etária de 40 a 65 anos. A Figura 3, esquematiza o desenho do estudo. O precipitante utilizado para a separação de HDL das demais lipoproteínas que contem apo-B foi o PEG 8.000 (*VWR Chemicals*®).

Foram testadas duas formas distintas de filtração no processo de separação da HDL. Após a precipitação, o sobrenadante foi separado utilizando filtro de membrana 0,22 $\mu$ m (Filtrilo®) ou filtro de papel quantitativo 1-2 $\mu$ m (Unifil®), que foi testado como uma alternativa para diminuir o custo do processo de separação. A seguir, foi feita a determinação do diâmetro da HDL através da técnica de ELL.

**Figura 3** - Delineamento do estudo.



Fonte: elaborado pela autora (2020).

## 4.2. Coleta e preparo das amostras

A coleta das amostras de sangue foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas (LAPAC)/Escola de Farmácia/UFOP, em sala adequada, seguindo as recomendações de boas práticas de laboratório.

Todas as participantes foram orientadas a realizar previamente jejum de 8 horas.

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa periférica, (a) em tubo com EDTA, para a separação e a avaliação do diâmetro da HDL e (b) em tubo sem anticoagulante para a determinação do perfil lipídico.

Após a obtenção do material biológico, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos a 25°C para a obtenção do plasma e do soro, utilizados como material de análise.

## 4.3. Precipitação e separação da HDL

Após a obtenção do plasma por centrifugação, foram separados 20 tubos de ensaio devidamente identificados, para que as 10 amostras fossem aliqüotadas em tubos para posterior análise com filtro de membrana 0,22µm ou com filtro de papel quantitativo 1-2µm.

A precipitação e a separação da HDL foram realizadas de acordo com o procedimento descrito a seguir, para cada amostra coletada:

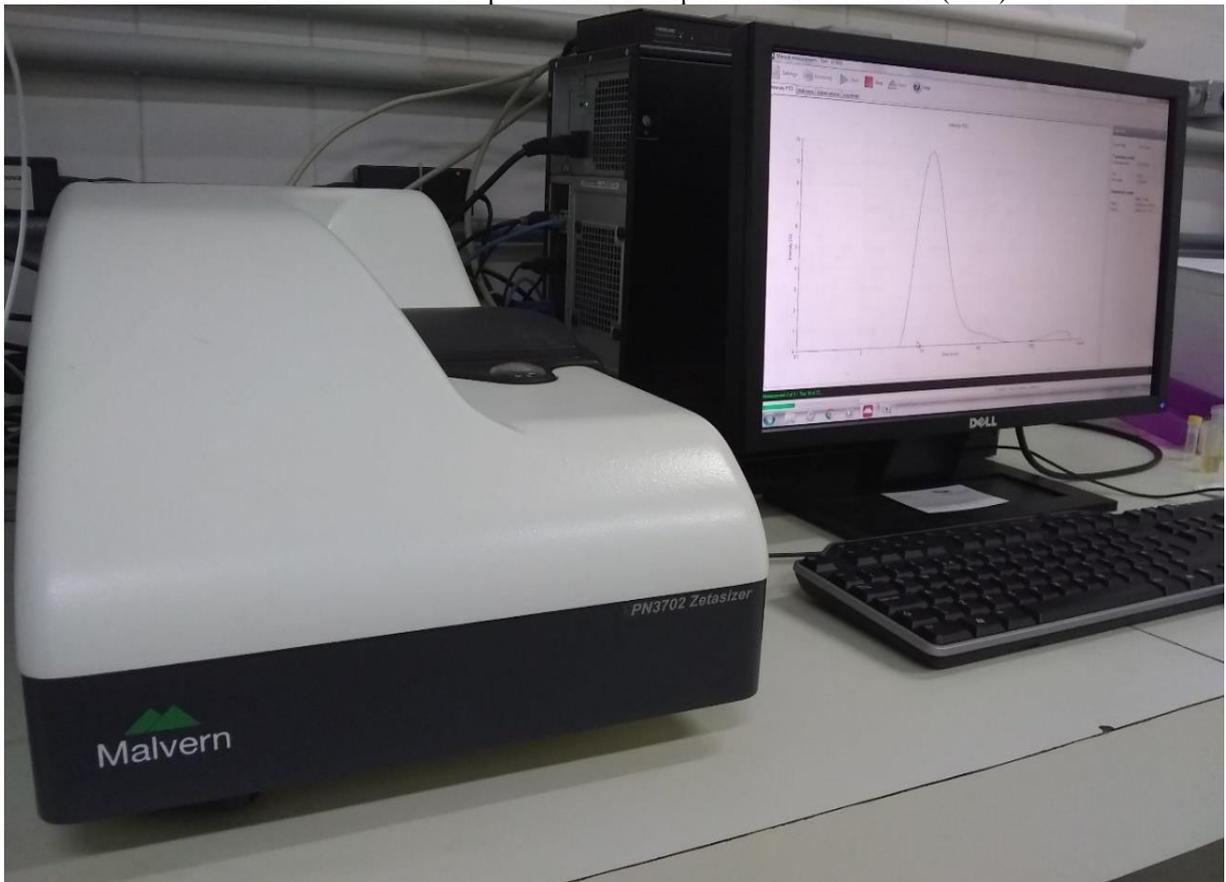
1. Adicionou-se 500 µL de solução do precipitante PEG 8.000 (400 g/L) a 500µL de cada amostra de plasma/EDTA.
2. Agitou-se em um misturador vórtex por 30 segundos.
3. Centrifugou-se a amostra a 3.500 rpm por 15 minutos a 25°C, para a separação do sobrenadante contendo HDL.
4. A uma alíquota de 500 µL desse sobrenadante, adicionou-se 1.500 µL de solução salina de NaCl 10 mmol/L, obtendo-se um volume total de 2 mL para cada amostra.
5. Filtrou-se utilizando filtro de membrana 0,22µm ou filtro de papel quantitativo 1-2µm. As amostras foram inicialmente aliqüotadas para que nesta etapa a mesma amostra pudesse ser filtrada em diferentes filtros, possibilitando a comparação.
6. Verteu-se as amostras filtradas, independentemente do tipo de filtro utilizado, em cubetas de quartzo para análise do diâmetro da partícula de HDL.

#### 4.4. Determinação do diâmetro da HDL

A determinação do diâmetro da HDL foi realizada através da técnica de ELL utilizando o instrumento *Zetasizer Nano ZS* (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) com um feixe de laser verde de 632nm (Figura 4). A luz dispersa foi coletada pelo detector em um ângulo de 173° usando a tecnologia *Non-Invasive Back-Scatter* (NBS) e direcionada a um correlacionador onde a intensidade da luz dispersa é convertida em medida de diâmetro (nm).

Os dados foram analisados pelo software *Zetasizer* (DTS, NanoSeries, versão 5.02, *Malvern*) e as informações obtidas do diâmetro da HDL foram relatadas como média Z por intensidade. Todas as medições foram realizadas a 25°C, em triplicata com medições automáticas com duração média de 13 minutos (LIMA; MARANHÃO, 2004).

**Figura 4** - Aparelho *Zetasizer Nano ZS* (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) utilizado para a determinação do diâmetro da HDL pela técnica de Espalhamento de luz laser (ELL).



Fonte: imagem da autora (2020).

#### 4.5. Avaliação do perfil lipídico

As dosagens bioquímicas de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) foram realizadas pelo método enzimático-colorimétrico. O colesterol HDL foi dosado pelo método homogêneo direto. LDL colesterol (LDLc) foi calculado a partir da equação de *Friedewald*, que é dada por  $[LDLc = CT - (HDLc + VLDLc)]$ , sendo  $VLDLc = TG/5$ , válida quando  $TG < 400$  mg/dL. O não-HDL foi calculado subtraindo o HDLc do colesterol total:  $[não-HDL = CT - HDLc]$ .

Todas as análises foram realizadas no analisador automatizado COBAS INTEGRA® 400 Plus (*Roche*), usando conjuntos diagnósticos específicos para o equipamento.

#### 4.6. Análise Estatística

As análises foram realizadas pelo programa SPSS 20.0 (*SPSS, Chicago, IL, EUA*). Para a comparação entre os grupos (métodos de separação) foi utilizado o teste *t de Student* para amostras pareadas e para a associação do diâmetro da HDL com o perfil lipídico foi utilizado o teste *t de Student* para amostras independentes. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. Em todas as análises estatísticas realizadas, foi considerado um nível de significância de 5%.

## 5. Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra a média  $\pm$  desvio-padrão da idade e das concentrações plasmáticas dos analitos do perfil lipídico das 10 participantes do estudo. A idade média das mulheres que constituíram o grupo amostral foi  $53 \pm 5,9$  anos.

Na análise do perfil lipídico foi observado que a média da concentração de CT estava acima dos valores referenciais (217,5 mg/dL, VR <190mg/dL). Considerando a categoria de risco intermediário (devido à faixa etária), as concentrações médias de LDLc (127,5 mg/dL; VR <100mg/dL) e não-HDLc (155,9 mg/dL; VR <130mg/dL) também se encontravam acima da meta. As médias das concentrações dos demais analitos estavam dentro dos valores de referência: HDLc (61,6 mg/dL; VR >40mg/dL) e TG (143,6 mg/dL; VR <150mg/dL).

**Tabela 1** - Idade e perfil lipídico das participantes do estudo (n=10).

Variável	Média ( $\pm$ DP)
Idade (anos)	53,0 ( $\pm$ 5,9)
Colesterol Total (mg/dL)	217,5 ( $\pm$ 50,8)
LDLc (mg/dL)	127,5 ( $\pm$ 40,6)
HDLc (mg/dL)	61,6 ( $\pm$ 13,0)
Triglicerídeos (mg/dL)	143,6 ( $\pm$ 110,1)
não-HDLc (mg/dL)	155,9 ( $\pm$ 55,2)

### 5.1. Teste dos filtros na técnica de ELL para determinação do diâmetro da HDL

O diâmetro da HDL e o índice de polidispersão obtidos com a técnica ELL utilizando diferentes filtros para a separação da lipoproteína são mostrados na Tabela 2.

Quando o tamanho da HDL foi determinado em amostras processadas utilizando filtro de membrana, o diâmetro médio obtido foi  $9,66 \pm 0,28$ nm, enquanto naquelas usando filtro de papel foi  $10,63 \pm 3,49$ nm. O índice de polidispersão foi  $0,24 \pm 0,01$  usando filtro de membrana e  $0,29 \pm 0,07$  quando se usou filtro de papel. Não foi observada diferença significativa no diâmetro da HDL e no índice de polidispersão obtidos com a técnica ELL utilizando diferentes filtros ( $p=0,413$  e  $p=0,083$ , respectivamente). O trabalho avaliou a eficiência de dois diferentes filtros,

buscando diminuição de custos e maior facilidade de execução durante o processo caso, o filtro de papel mostrasse eficiência semelhante ao filtro de membrana, podendo substituí-lo. Apesar de observamos diferença não-significativa entre o filtro de membrana e o de papel, o desvio padrão foi maior no uso do filtro de papel, o que indica maior variabilidade. Este resultado pode indicar superioridade do filtro de membrana.

**Tabela 2-** Diâmetro da HDL (nm) e índice de polidispersão determinados pela técnica ELL, em amostras precipitadas por PEG 8.000 e filtradas com diferentes filtros (n=10).

Medidas	PEG 8000		
	filtro 0,22 $\mu$ m	filtro 1-2 $\mu$ m	p-valor
Diâmetro da HDL (nm)	9,66 ( $\pm$ 0,28)	10,63 ( $\pm$ 3,49)	0,413
Índice de Polidispersão	0,24 ( $\pm$ 0,01)	0,29 ( $\pm$ 0,07)	0,083

**Nota:** Teste *t de Student* para amostras pareadas.

Os resultados obtidos neste trabalho são compatíveis com os anteriormente descritos na literatura que analisaram o tamanho da HDL e descreveram uma variação entre 5-12nm (RIZZO, 2014), podendo encontrar resultados até 12-15 nm (SILVA, 2019).

Giribela (2007) encontrou diâmetro da HDL entre 8,8nm e 9,0nm em amostras de 40 mulheres normolipidêmicas na pré (n=22) e na pós menopausa (n=18) utilizando a técnica de ELL e filtro de membrana 0,22 $\mu$ m. Outros trabalhos utilizando diferentes populações, mas a mesma técnica, também obtiveram resultados semelhantes. Tavoni (2018), encontrou valores entre 8,43nm  $\pm$  0,79 e 8,56nm  $\pm$  0,67 em população mista de 20 a 60 anos apresentando ou não doenças cardiovasculares.

Valverde (2012), também utilizou a técnica de ELL e filtração por membrana 0,22 $\mu$ m de porosidade, em 100 indivíduos de ambos os sexos e encontrou valores por média  $\pm$  desvio-padrão de 8,9  $\pm$  1,1nm para normolipidêmicos; 7,5  $\pm$  1,9nm para hipercolesterolemia isolada; 9,3  $\pm$  1,0nm para hipertrigliceridemia isolada; 7,9  $\pm$  1,3nm para HDL baixo e 7,6  $\pm$  1,7nm para dislipidemia mista.

Tangney e colaboradores (2001) avaliando mulheres climatéricas na fase de pós-menopausa fazendo uso de terapia hormonal, obtiveram diâmetro de 9,21 a 9,34nm com a técnica de RMN. Li e colaboradores (1996), utilizando eletroforese em gel obtiveram diâmetros entre 8,42nm a 8,99nm, em amostras de 72 mulheres na pré-menopausa e 74 na pós-menopausa.

O PEG 8000 se mostrou capaz de realizar a precipitação das lipoproteínas contendo apo-B permitindo a obtenção do sobrenadante com a HDL. Silva e colaboradores (2019) demonstraram a eficiência de PEG 8000 como precipitante para a separação de lipoproteínas e posterior medida do diâmetro da HDL, sendo este compatível com os valores descritos na literatura e similar ao obtido quando a separação foi realizada por ultracentrifugação. Ainda de acordo com o estudo, os resultados deram suporte para escolher o PEG 8.000 como agente precipitante para o dimensionamento da HDL quando comparado com sulfato de dextrano/MgCl<sub>2</sub> e ácido fosfotúngstico/Ca<sup>2+</sup>. PEG 8.000 foi o precipitante que melhor manteve as características estruturais da HDL.

Outra medida realizada na técnica ELL é o índice de polidispersão, que neste trabalho também não diferiu significativamente entre os processos de filtração. O índice de polidispersão está relacionado à heterogeneidade do tamanho das partículas em suspensão (SOUZA *et al.*, 2012). Segundo Moraes (2009), valores de polidispersividade menores que 0,2 indicam homogeneidade de tamanho das partículas na amostra. Os valores obtidos para o filtro 0,22µm (0,24) e para filtro de papel quantitativo 1-2µm (0,29), apesar da associação não significativa, demonstram que o primeiro foi um pouco melhor em obter diâmetros mais homogêneos.

Em análises preliminares, foi feito um trabalho piloto testando o PEG 6000 como técnica de precipitação para a obtenção da fração sobrenadante contendo apenas a HDL e a centrifugação a 15000 rpm, por 15 minutos a 25°C como método de separação. Contudo, nenhumas dos processos se mostraram eficientes, gerando resultados não-reprodutíveis e não-comparáveis durante a determinação do diâmetro da HDL pela técnica de ELL.

## **5.2. Associação da concentração dos analitos do perfil lipídico com o diâmetro da HDL determinado utilizando diferentes filtros na técnica ELL**

Neste trabalho, não foi encontrada associação significativa entre o diâmetro da HDL e a concentração dos analitos do perfil lipídico ( $p > 0,05$ ), independente do filtro utilizado, como mostrado na Tabela 3.

No entanto, quando se utilizou filtro de membrana 0,22µm, foi observado que mulheres com níveis médios de HDL mais altos ( $> 50$  mg/dL), apresentavam maior diâmetro da partícula, se comparadas àquelas com níveis mais baixos ( $\leq 50$  mg/dL) da lipoproteína ( $9,77 \pm 0,26$  nm vs  $9,40 \pm 0,13$  nm;  $p = 0,05$ ). Este resultado, apesar de não significativo, está de acordo com o esperado.

**Tabela 3** - Associação entre os analitos do perfil lipídico e o diâmetro das partículas de HDL avaliadas com ELL em amostras processadas utilizando diferentes filtros.

Analitos	Diâmetro da HDL			
	filtro 0,22 µm	p-valor	filtro 1-2 µm	p-valor
<b>HDLc</b>				
> 50 mg/dL (n=7)	9,77 (±0,26)	0,050	10,12 (±1,70)	0,697
≤ 50 mg/dL (n=3)	9,40 (±0,13)		11,83 (±6,56)	
<b>Colesterol Total</b>				
< 190 mg/dL (n=5)	9,58 (±0,26)	0,412	10,20 (±2,18)	0,721
≥ 190 mg/dL (n=5)	9,74 (±0,31)		11,06 (±4,71)	
<b>LDLc</b>				
< 100 mg/dL (n=4)	9,56 (±0,30)	0,396	10,36 (±2,49)	0,855
≥ 100 mg/dL (n=6)	9,73 (±0,28)		10,81 (±4,25)	
<b>Triglicerídeos</b>				
< 150 mg/dL (n=8)	9,61 (±0,26)	0,327	11,19 (±3,72)	0,343
≥ 150 mg/dL (n=2)	9,85 (±0,42)		8,41 (±0,47)	
<b>Colesterol não-HDL</b>				
< 130 mg/dL (n=5)	9,58 (±0,26)	0,412	10,20 (±2,18)	0,721
≥ 130 mg/dL (n=5)	9,74 (±0,31)		11,06 (±4,71)	

Estudos mostram que as partículas de HDL consideradas grandes (9,4-14nm) associam-se inversamente ao risco de DCV, enquanto aquelas consideradas pequenas (7,3-8,2nm) mostram associação positiva quando medidas por RMN (ROSENSON; OTVOS; FREEDMAN, 2002; MORA *et al.*, 2009). Segundo Azevedo e colaboradores (2011), pacientes com doença arterial coronariana apresentam menores tamanhos da HDL (8,7nm) quando comparados aos saudáveis (9,7nm).

Pascot e colaboradores (2001) buscaram documentar a importância de avaliar o tamanho da HDL como característica de dislipidemia em indivíduos obesos e com resistência à insulina. Foi demonstrado que indivíduos com HDL de maior tamanho (8,76±2,0nm) apresentaram redução no acúmulo de adiposidade visceral e menores respostas glicêmicas a ingestão oral de glicose. Além disso, encontraram correlação positiva entre o diâmetro da partícula de HDL e os níveis séricos de HDL, representando um perfil lipídico menos propenso ao desenvolvimento do risco cardiovascular, ao passo que a maior frequência de HDL de menor tamanho em indivíduos com maiores níveis de triglicérides apresentou perfil aterogênico.

Johansson, Carlson e Landou (1991) utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida, estudaram uma população de 60 indivíduos que sobreviveram a um infarto agudo do miocárdio, e observaram que os níveis da subfração HDL-2 (HDL grande) eram maiores em normolipidêmicos do que em indivíduos com hipertrigliceridemia, e que havia forte relação direta entre os níveis plasmáticos totais de HDL e a subfração HDL-2, sendo inversa ao risco cardiovascular.

Já El Harchaoui e colaboradores (2009), avaliando indivíduos entre 45 e 79 anos em um estudo de caso-controle com a técnica de RMN, demonstraram forte relação entre os níveis plasmáticos de HDL e partículas grandes de HDL (8,9 nm), ao passo que os níveis totais de triglicérides foram inversamente proporcionais ao tamanho da HDL.

Fonseca, Silva e Ferreira (2017), em trabalho que estudou as subfrações de lipoproteínas em mulheres na menopausa, por diversas técnicas de determinação do diâmetro da HDL, verificaram que nessas mulheres ocorre relação inversa entre os níveis da subfrações de HDL, principalmente HDL-2 (grande) e os níveis plasmáticos de LDL, TG e CT. Assim como Valverde (2012) observou que pacientes com dislipidemia mista, apresentando níveis plasmáticos elevados de CT e TG apresentou a menor média de diâmetro ( $11,6 \pm 1,3\text{nm}$ ) obtido, demonstrando relação entre estes analitos do perfil lipídico e o diâmetro da HDL.

Neste trabalho, um ponto importante que pode ter influenciado na associação entre o diâmetro da HDL e os componentes do perfil lipídico é o fato de a média das concentrações séricas dos analitos estarem com valores dentro ou pouco alteradas em relação aos valores de referência/categorias de risco.

Além disto, verificamos que o diâmetro nas amostras deste estudo variou de 8,015 a 13,43nm (com médias de 9,66 e 10,63nm), ou seja, dentro dos valores de descritos para HDL grande (ROSENSON; OTVOS; FREEDMAN, 2002; MORA et al., 2009). Isto pode também explicar o fato de não termos encontrado associação com o perfil lipídico. Há exemplo dos resultados encontrados neste trabalho, Lima e Maranhão (2004), também não observaram significância entre o diâmetro da HDL e os níveis plasmáticos de HDL e TG.

Outro viés é o pequeno número amostral. Contudo deve-se ressaltar que o intuito do trabalho foi a otimização da técnica, o que não demanda um grande número amostral. Vale a pena ainda ressaltar que, um maior número amostral implicaria em maior custo para a realização do trabalho.

## **6. Conclusão**

A técnica de Espalhamento de luz laser se mostrou de fácil execução e eficiente na determinação do diâmetro da partícula de HDL, podendo ser uma opção a ser considerada para utilização na rotina laboratorial. O filtro de membrana se mostrou eficaz no processo de isolamento da HDL, enquanto o filtro de papel, que representava uma forma de diminuição do custo da técnica não mostrou eficácia na etapa de filtração.

## 7. Referências

ALAGONA, C. *et al.* A low high-density lipoprotein (HDL) level is associated with carotid artery intima-media thickness in asymptomatic members of low HDL families. **Atherosclerosis**, v. 165, n. 2, p. 309-16, Dec. 2002.

ALLEN, J. K. *et al.* An enzymatic and centrifugal method for estimating high density lipoprotein cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 325-7, Feb. 1979.

ANAGNOSTIS, P. *et al.* Effects of menopause, gender and age on lipids and high-density lipoprotein cholesterol subfractions. **Maturitas**, v. 81, n. 1, p. 62-8. May. 2015.

ANDERSON, D. W. *et al.* High density lipoprotein distribution. Resolution and determination of three major components in a normal population sample. **Atherosclerosis**, v. 29, n. 2, p. 161-179, Feb. 1978.

ANSELL, B. J.; FONAROW, G. C.; FOGELMAN, A. M. The paradox of dysfunctional high-density lipoprotein. **Current Opinion in Lipidology**, v. 18, n. 4, p. 427–434, Aug. 2007.

AZEVEDO, C. H. *et al.* (2011). Simultaneous transfer of cholesterol, triglycerides, and phospholipids to high-density lipoprotein in aging subjects with or without coronary artery disease, **clinical science**, v. 66, n. 9, 2011.

ASZTALOS, B. F. *et al.* Two dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1169, n. 3, p. 291-300, Sep. 1993.

BACHMANN, G. Physiologic aspects of natural and surgical menopause. **The journal of Reproductive Medicine**, 46, 3 Suppl: p. 307-15, Mar. 2001.

BARTER, P. *et al.* High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis: the unanswered questions. **Atherosclerosis**, v. 168, p.195–211, Jun. 2003.

BERTOLIM, D. P. *et al.* Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2019 Realização: Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 113, n. 4, p. 787-891, 2019.

BLACKBURN, P. *et al.* Angiographically-assessed coronary artery disease associates with HDL particle size in women. **Atherosclerosis**, v. 223, n. 2, p. 359-64, Aug. 2012.

BLANCHE, P. J. *et al.* Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 665, n. 3, p. 408-419, Sep. 1981.

BOTS, M. L. *et al.* Total and HDL cholesterol and risk of stroke. EUROSTROKE: a collaborative study among research centres in Europe. **Journal of Epidemiology e Community Health**, v. 56, Suppl. 1, i19-i24, Feb. 2002

BRASIL. Ministério da saúde. Manual de atenção à mulher no climatério/menopausa. **Bibliofarma**. 2008. Disponível em: <http://bibliofarma.com/manual-de-atencao-a-mulhernocli-materiomenopausa/>.

CAMONT, L.; CHAPMAN, M. J.; KONTUSH, A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, p. 594–603, Oct, 2011.

CAMPOS, H. *et al.* Differences in low density lipoprotein subfractions and apolipoproteins in premenopausal and postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 67, n. 1, p. 30–5, Jul. de 1988.

CHAE, C. U.; DERBY, C. A. The menopausal transition and cardiovascular risk. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 38, p. 477- 488, Sep. 2011.

CHAPMAN, M. J. *et al.* A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. **Journal of Lipid Research**, v. 22, n. 2, p. 339-58, Feb. 1981.

CHEUNG, M. C.; ALBERS, J. J. Distribution of high-density lipoprotein particles with different apoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. **J. Lipid Res**, v. 23, n. 5, p. 747-753, Jul. 1982.

CHOI, Y. *et al.* Menopausal stages and serum lipid and lipoprotein abnormalities in middle-aged women. **Maturitas**, v. 80, n. 4, p. 399-405, Apr. 2015.

COLLINS, P. *et al.* Cardiovascular risk assessment in women: an update. **Climateric**, v. 19, p. 329-336, Jun. 2016.

CORDOVA, C. M. M.; SCHNEIDER, C. R.; JUTTEL, I. D. Avaliação da dosagem direta do colesterol-LDL em amostras de sangue de 10.664 pacientes em comparação com o uso da fórmula de Friedewald. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 83, n. 6, p. 476-481, Dec. 2004.

DE LORENZI, D. R. S. *et al.* Fatores indicadores da sintomatologia climatérica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**. Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 7-11, Jan. 2005.

DERBY, C. A. *et al.* Lipid changes during the menopause transition in relation to age and weight: the Study of Women's Health Across the Nation. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, p. 1352-1361, Jun. 2009.

DREXEL, H. *et al.* Relation of the level of high-density lipoprotein subfractions to the presence and extent of coronary artery disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 70, n. 4, p. 436-40, Aug. 1992.

EL HARCHAOUI, K. *et al.* High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. **Annals of internal medicine**, v. 150, p. 84-93, 2009.

EL KHOUDARY, S. R. *et al.* Cholesterol Efflux Capacity and Subclasses of HDL Particles in Healthy Women Transitioning Through Menopause. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 101, n. 9, p. 3419-3428, Sep. 2016.

EL KHOUDARY, S. R. HDL and the menopause. **Current Opinion in Lipidology**, v. 28, n. 4, p. 328-336, Aug. 2017.

EL KHOUDARY, S. R. *et al.* HDL (High-Density Lipoprotein) Metrics and Atherosclerotic Risk in Women. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 38, n. 9, p. 2236-2244, Sep. 2018.

ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP. Perimenopausal risk factors and future health. **Human Reproduction Update**, v. 17 n. 5, p. 706-17, Sep. 2011.

FALUDI, A. A. *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, suplemento. 1, p. 76, Ago. 2017.

FAN A. Z.; DWYER J. Sex differences in the relation of HDL cholesterol to progression of carotid intima-media thickness: the Los Angeles Atherosclerosis Study. **Atherosclerosis**, v. 195, p. 191-196, May. 2007.

FAZIO, S.; PAMIR, N. HDL particle size and functional heterogeneity. **Circulation Research**, v. 119, n. 6, p. 704-707, Sep. 2016.

FONSECA, M.; SILVA, I. T.; FERREIRA, S. Impact of menopause and diabetes on atherogenic lipid profile: is it worth to analyse lipoprotein subfractions to assess cardiovascular risk in women? **Diabetology e metabolic syndrome**, v. 9, p. 22, Apr. 2017.

FRANCIS, G. A. The complexity of HDL. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, n. 12, p. 1286-93, Dec. 2010.

FREEDMAN, D. S. *et al.* Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 18, n. 7, p. 1046-53, Jul. 1998.

GUEY, L. T. *et al.* Relation of increased prebeta-1 high-density lipoprotein levels to risk of coronary heart disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 108, n. 3, p. 360-6, Aug. 2011.

GIRIBELA, Aricia Helena Galvão. **Avaliação da influência da menopausa no tamanho das partículas da HDL e na sua capacidade de receber lipídios de uma nanoemulsão semelhante à LDL.** 2007. Tese (Doutorado em Obstetrícia e Ginecologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5139/tde-23102007-111819/pt-br.php>. Acesso em: 2020-11-28.

GUO, Z. G. *et al.* Laboratory investigation of dysfunctional HDL. **Chemistry and Physics of Lipids**, 165, p. 32– 37, 2012.

HARLOW, D. S. *et al.* Executive summary of straw + 10: addressing the Unfinished Agenda of Staging Reproductive Aging. **NIH Public Access. Climacteric**, vol. 15(2): n. 105–114, Apr. 2012.

HUBBARD, R. S. *et al.* Evaluation of a Rapid Homogeneous Method for Direct Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol, **American Journal of Clinical Pathology**, v. 110, n. 4, p. 495–502, Oct. 1998.

JEYARAJAH, E. J.; CROMWELL, W. C.; OTVOS, J. D. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Clinical Laboratory of Medicine**, v. 26, n. 4, p. 847-870, Dec. 2006.

JOHANSON, J., CARLSON, L. A., LANDOU, C. Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 11, p. 174–82, 1991.

KARATHANASIS, S. K. *et al.* The Changing Face of HDL and the Best Way to Measure It. **Clinical Chemistry**. v. 63, n. 1, p. 196-210, Jan. 2017.

KUCERA, M. *et al.* Effect of Atorvastatin on Low-Density Lipoprotein Subpopulations and Comparison Between Indicators of Plasma Atherogenicity: a Pilot Study. **Angiology**, v. 65, n. 9, p. 794-9, Oct. 2013.

LAMON-FAVA, S. *et al.* Plasma levels of HDL subpopulations and remnant lipoproteins predict the extent of angiographically-defined coronary artery disease in postmenopausal women. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 28, n. 3, p. 575–579, Jan. 2008.

LAGOS, K. G. *et al.* Alterations in the high-density lipoprotein phenotype and HDL associated enzymes in subjects with metabolic syndrome. **Lipids**, v. 44, n. 1, p. 9-16, Jan. 2009.

LI, Z.; *et al.* Effects of gender and menopausal status on plasma lipoprotein subspecies and particle sizes. **Journal of Lipid Research**, v. 37, n. 9, p. 1886-96, Sep. 1996.

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

LUDWIG, A. K. *et al.* Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. **The Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, 1528109, Oct, 2018.

LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M. C. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. **Sub-cellular Biochemistry**, 51, p. 183–227, 2010.

MARTINHÃO, M. A. *et al.* Padronização da análise de laser light scattering para determinar o diâmetro da lipoproteína de alta densidade após precipitação com polietilenoglicol. In: XX CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 10, 2012, Campinas, São Paulo, Brasil, 2012. v. 1, p.1-1.

MASSON, W. *et al.* Association between non-HDL-C/HDL-C ratio and carotid atherosclerosis in postmenopausal middleaged Women. **Climatéric**, v. 22, n. 5, p. 518-522, Oct. 2019.

MATTHEWS, K. A. *et al.* Are changes in cardiovascular disease risk factors in midlife women due to chronological aging or to the menopausal transition? **Jornal of the American College of Cardiology**, v. 54, p. 2366-2373, Dec. 2009.

MORA, S. *et al.* Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. **Circulation**, v. 119, p. 931–939, Feb. 2009.

MORAES, Carolina Morales. **Preparo, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais**. Tese (Mestrado em Bioquímica), Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2009. Disponível em: [http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/CAMP\\_e412439fa8f4b40a16a0c73256961ae6](http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/CAMP_e412439fa8f4b40a16a0c73256961ae6). Acesso em: 01 out. 2020.

MUSUNURU, K. *et al.* Ion mobility analysis of lipoprotein subfractions identifies three independent axes of cardiovascular risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 29, n. 11, p. 1975-1980, Nov. 2009.

NOTO, H. Latest Insights Into High-Density Lipoprotein Functions. **The Endocrinologist**, v. 19, n. 4, Aug. 2009.

OKADA, M. *et al.* Direct measurement of HDL cholesterol: method eliminating apolipoprotein E-rich particles. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 15, n. 4, p. 223-9, 2001.

ORAVEC, S. *et al.* Atherogenic versus non atherogenic lipoprotein profiles in healthy individuals. Is there a need to change our approach to diagnosing dyslipidemia? **Current Medicinal Chemistry**, 2014.

OTVOS, J. D. *et al.* Low-density lipoprotein and high-density lipoprotein particle subclasses predict coronary events and are favorably changed by gemfibrozil therapy in the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. **Circulation**, v. 113, n. 12, p. 1556-1563, Mar. 2006.

PARRA, E. S. *et al.* HDL size is more accurate than HDL cholesterol to predict carotid subclinical atherosclerosis in individuals classified as low cardiovascular risk. **Plos One**, v. 9, n. 12, 114212, Dec. 2014.

PASCOT, A. I. *et al.* Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 12, p. 2007–2014, Dec. 2001.

PENTTILÄ, I. M. *et al.* Comparison of different analytical and precipitation methods for direct estimation of serum high-density lipoprotein cholesterol. **Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation**, v. 41, n. 4, p. 353-60, Jun. 1981.

PIRILLO, A.; NORATA, G. D.; CATAPANO, A. L. High-Density Lipoprotein Subfractions – What the Clinicians Need to Know. **Cardiology**, v. 124, p. 116–125, 2013.

PHILLIPS, M. C. Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 35, p. 24020-24029, Aug. 2014.

RIZZO, M. *et al.* Small, dense low-density lipoproteins (LDL) are predictors of cardio- and cerebro-vascular events in subjects with the metabolic syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 70, n. 6, p. 870-5, Jun. 2009.

RIZZO, M. *et al.* Subfractions and Subpopulations of HDL: an update. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 25, p. 2881-2891, 2014.

ROSENSON, R. S.; OTVOS, J.D.; FREEDMAN, D. S. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC-I) trial. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, p. 89–94, Jul. 2002.

ROSENSON, R. S. *et al.* HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 392-410, Feb. 2011.

RYE, K. A. *et al.* The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. **Journal of Lipid Research**, v. 50, Suppl. S195-S200, Apr. 2009.

SCHECTMAN, G.; SASSE, E. Variability of lipid measurements: relevance for the clinician. *Clinical Chemistry*, v. 39, n. 7, p. 1495-503, Jul. 1993.

SKINNER, E. R. High-density lipoprotein subclasses. *Current Opinion in Lipidology*, v. 5, p. 241–7, Jun. 1994.

SOUZA, P. M. *et al.* Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. *Química Nova*, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012.

STEVENSON, J. C.; CROOK, D.; GODSLAND, I. F. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. *Atherosclerosis*, v. 98, n. 1, p. 83-90, Jan. 1993.

SUPERKO, H. R. *et al.* High-density lipoprotein subclasses and their relationship to cardiovascular disease. *Journal of Clinical Lipidology*, 6, p. 496-523, Nov-Dec. 2012.

TANGNEY, C. C. *et al.* Oral 17beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate therapy in postmenopausal women increases HDL particle size. *Atherosclerosis*, v. 155, n. 2, p. 425-30, Apr. 2001.

TAVONI, Thauany Martins. **Metabolismo e função das lipoproteínas de alta densidade (HDL) em indivíduos idosos: efeito da presença de diabetes mellitus tipo 2 e doença coronariana obstrutiva.** Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-08032019-181032/pt-br.php>. Acesso em: 10 jul. 2020.

TEIXEIRA, R. M. *et al.* HDL Particle Size and Functionality Comparison between Patients with and without Confirmed Acute Myocardial Infarction. *Cardiology Research and Practice*, v. 2019, Mar. 2019.

TIAN, L. *et al.* The impact of plasma triglyceride and apolipoproteins concentrations on high-density lipoprotein subclasses distribution. *Lipids Health Disiase*. 2011, p. 10-17, Jan, 2011.

VALVERDE, Ana Paula Caires dos Santos. Tese de Mestrado. **Dislipidemias e transporte reverso do colesterol: incorporação de colesterol livre, atividade da paraoxonase e índices calculados na avaliação do risco cardiovascular.** Tese (mestrado em Farmácia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/22683>. Acesso em: 05 jul. 2020.

VERIC, J. *et al.* LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle-aged Serbian population. *Clinical Biochemistry*, n. 40, p. 310–316, Mar. 2007.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, J. R.; ASSMANN, G. High-density lipoproteins and arteriosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.21, p.13 – 27, Jan. 2001.

WILLIAMS, P. T. *et al.* Effects of weight-loss by exercise and by diet on apolipoproteins A-I and A-II and the particle-size distribution of high-density lipoproteins in men. **Metabolism**, v. 41, n. 4, p. 441-449, Apr. 1992.

YUANA, Y. *et al.* Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. **Journal of Extracellular Vesicles**, 3, Jun. 2014.

YANG, Y. *et al.* Relationship between plasma lipid concentrations and HDL subclasses. **Clinica Chimica Acta**, v. 354, n. 1-2, p. 49-58, Apr. 2020.