

Camila Fragata de Carvalho

As Lipoproteínas de Alta Densidade como Alvo Terapêutico das Doenças Cardiovasculares

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Leonor Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Camila Fragata de Carvalho

As Lipoproteínas de Alta Densidade como Alvo Terapêutico das Doenças Cardiovasculares

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Leonor Almeida e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Camila Fragata de Carvalho, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010130476 declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 10 de Julho de 2015.

Camila Fragata de Carvalho

A Orientadora da Monografia

(Professora Doutora Leonor Almeida)

A Aluna

(Camila Fragata de Carvalho)

AGRADECIMENTOS

Ao longo do meu percurso académico, foram várias as pessoas que me deram apoio e sem as quais seria impossível chegar ao fim desta etapa.

Assim sendo, começo por agradecer aos meus pais e à minha avó por toda a paciência nos momentos de maior tensão, pelo apoio incondicional e pela eterna amizade e carinho.

Agradeço ainda ao Diogo e às minhas grandes amigas Marta e Marina por todos os momentos de alegria e tristeza que passamos juntos e por toda a força que sempre me deram.

À Joana e ao André pelas tardes e noites de estudo e pela grande amizade que criámos, à Nela e ao Tozé por todo o carinho e amizade.

Dirijo por fim um agradecimento muito especial à minha orientadora deste trabalho, Professora Doutora Leonor Almeida, pelos conhecimentos transmitidos, bem como pelo seu grande apoio e amizade, não só nesta fase final, mas durante todo o meu percurso académico.

“Only those who dare to fail greatly can ever achieve greatly.”

Robert F. Kennedy

ABREVIATURAS

ABC	Transportador <i>ATP-Binding Cassete</i>
Apo	Apoproteína/Apolipoproteína
ASO	Oligonucleótido <i>antissense</i> (<i>Antissense Oligonucleotide</i>)
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CAD	Doença Arterial Coronária (<i>Coronary Artery Disease</i>)
CE	Colesterol Esterificado
CETP	Proteína Transferidora do Colesterol Esterificado (<i>Cholesterylester Transfer Protein</i>)
COX	Cicloxigenase
CRP	Proteína C Reativa (<i>C Reactive Protein</i>)
DCV	Doenças Cardiovasculares
DP₁	Recetor Prostaglandina D ₂
EAM	Enfarte Agudo do Miocárdio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial (<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
EP	Prostaglandina E
GPx	Glutationa Peroxidase (<i>Glutathione Peroxidase</i>)
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade (<i>High-Density Lipoprotein</i>)
HDL-C	Colesterol-HDL
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-Metilglutaril-Coenzima A
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular (<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule</i>)
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermédia (<i>Intermediate-Density Lipoprotein</i>)
IL	Interleucina
LCAT	Lecitina-Colesterol Aciltransferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade (<i>Low-Density Lipoprotein</i>)
LDL-C	Colesterol-LDL
LXR	Recetores X hepáticos (<i>Liver X Receptors</i>)
LH	Lipase Hepática
LPL	Lipoproteína Lipase
Lp-PLA₂	Fosfolipase A ₂ associada a lipoproteína (<i>Lipoprotein Associated Phospholipase A₂</i>)
MiR	Micro-RNA
MPO	Mieloperoxidase

NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
PAI	Inibidor da Ativação do Plasminogénio (<i>Plasminogen Activation Inhibitor</i>)
PAF-AH	Fator Ativador de Plaquetas-Acetil-Hidrolase (<i>Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase</i>)
PG	Prostaglandina
PGI₂	Prostaciclina
PON-I	Paraoxonase I
PPAR	Recetores Ativados por Proliferador de Peroxissoma (<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor</i>)
RCT	Transporte Reverso do Colesterol (<i>Reverse Cholesterol Transport</i>)
rHDL	HDL Recombinante
SIP	Esfingosina-1-fosfato (<i>Sphingosine-1-Phosphate</i>)
SR	Recetor Scavenger (<i>Scavenger Receptor</i>)
TG	Triglicérido/Triglicerídeo
VCAM	Molécula de Adesão Vascular (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>)
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (<i>Very Low-Density Lipoprotein</i>)

ÍNDICE

RESUMO/ABSTRACT	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. AS HDL: CARACTERIZAÇÃO E METABOLISMO	3
3. ATEROSCLEROSE E MECANISMOS SUBJACENTES	5
4. MECANISMOS DE AÇÃO DAS HDL NA PROTEÇÃO CONTRA AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES	
4.1. Efluxo de colesterol/Transporte Reverso	7
4.2. Ação Anti-inflamatória	8
4.3. Ação Antitrombótica e Profibrinolítica	8
4.4. Ação Antioxidante ...	9
4.5. Produção Endotelial de Óxido Nítrico	9
4.6. Migração Endotelial de Proteínas	10
5. HDL DISFUNCIONAL	11
6. TERAPÊUTICA DIRIGIDA AOS AUMENTOS DO TEOR PLASMÁTICO E/OU DA FUNCIONALIDADE DAS HDL	
6.1. Terapêuticas iniciais	
6.1.1. Niacina	13
6.1.2. Fibratos	14
6.1.3. Estatinas	14
6.1.4. Ezetimiba	14
6.1.5. Tiazolidinedionas	15
6.2. Novos alvos terapêuticos	
6.2.1. Inibidores das CETP	15
6.2.2. Infusões de HDL recombinante contendo ApoA-I	17
6.2.3. Regulação da Produção Endógena de ApoA-I	17
6.2.4. Regulação dos Recetores Hepáticos X	18
6.2.5. Silenciamento do MiR-33	18
6.2.6. Peptídeos miméticos da ApoA-I ...	19
6.2.7. Inibidores da Mieloperoxidase	20
7. CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Constituição da partícula HDL	3
Figura 2: Metabolismo geral dos lípidos	4
Figura 3: Metabolismo das HDL	5
Figura 4: Fases do desenvolvimento da placa aterosclerótica	6
Figura 5: Distribuição mundial das principais causas de morte	7
Figura 6: Principais vias do efluxo de colesterol	8
Figura 7: Transporte de SIP mediado pelas HDL	10
Figura 8: Mecanismo de ação dos inibidores da CETP	16
Figura 9: Regulação da inflamação e do metabolismo lipídico pelos recetores hepáticos X nos macrófagos	19
Figura 10: O AZ876 e o GW6340	19
Tabela I: Defeitos genéticos (mutações, deleções e sobre-expressão) da ApoAI, ABCAI, LCAT E SR-BI que alteram a funcionalidade das HDL	12
Tabela II: Eficácia de fármacos no aumento no Colesterol HDL (HDL-C)	15
Tabela III: Eficácia comparativa dos inibidores das CETP	17

RESUMO

O colesterol contido nas lipoproteínas de elevada densidade (HDL-C), frequentemente designado de “colesterol bom”, é considerado um biomarcador destas lipoproteínas, as quais estão associadas à redução do risco cardiovascular através de diversos mecanismos, sendo consideradas um fator chave na inibição do desenvolvimento da placa aterosclerótica. No entanto, a natureza da relação entre as lipoproteínas de alta densidade (HDL), em termos do HDL-C, e a atividade anti-aterogénica, não está ainda bem definida, encontrando-se alguma ambiguidade e até contradição nos resultados dos estudos e ensaios clínicos existentes. A ideia inicial de que o simples aumento dos teores plasmáticos de HDL reduzia o risco cardiovascular - HDL *hypothesis* - está agora posta de lado, tendo-se verificado que as propriedades qualitativas destas partículas são também fatores críticos no desenvolvimento da aterosclerose - HDL *function hypothesis*. Diversas alternativas terapêuticas são apontadas direcionadas para os aumentos dos teores plasmáticos e/ou da funcionalidade das HDL, dando-se ênfase ao contínuo desenvolvimento de novas abordagens mais eficazes e com efeitos secundários mais reduzidos.

ABSTRACT

The cholesterol within high-density lipoproteins (HDL-C), also known as “good cholesterol”, is undoubtedly associated with a reduction of the cardiovascular risk. Acting by many different mechanisms, HDL particles have been considered to be a key factor in the development of the atherosclerotic plaque. However, the nature of the relation between HDL and its anti-atherogenic activity is still uncertain, given the ambiguity and contradiction of the latest researches. The initial HDL hypothesis, in which HDL-C concentration is the only factor considered in the prediction of cardiovascular risk, has now been overcoming – it appears that the qualitative properties of this lipoprotein play a key role in the inhibition of atherosclerotic plaque development (HDL function hypothesis). There are several therapeutic approaches targeting HDL levels and its functionality, which have been increasingly more effective and less harmful.

PALAVRAS-CHAVE

HDL | HDL-C | Apo-AI | Aterosclerose | Doenças cardiovasculares | HDL disfuncional | Transporte reverso do colesterol | Terapia HDL.

I. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV), através das suas manifestações clínicas mais comuns, como o enfarte do miocárdio (EAM) e o acidente vascular cerebral (AVC), continuam a ser uma das principais causas de morte e morbidade dos países desenvolvidos (Choudhury *et al.*, 2004; Gaziano *et al.*, 2006; Galkina & Ley, 2009). Múltiplos fatores de risco poderão ser apontados, ocupando a dislipidemia associada à hipercolesterolemia LDL um lugar de relevo, assim como a diminuição dos teores plasmáticos de HDL, em termos de HDL-C. Tem sido estabelecida uma forte correlação entre a dislipidemia e a aterosclerose, uma patologia das grandes artérias que leva ao estreitamento do seu lúmen, podendo esta constituir, a longo prazo, a causa subjacente aos acidentes cardiovasculares.

As terapêuticas dirigidas para as DCV incluem intervenções ao nível do estilo de vida e de fatores suscetíveis a modificação, tais como hipertensão, obesidade e dislipidemia. Esta última tem sido um alvo terapêutico muito explorado, particularmente a hipercolesterolemia associada às LDL. De facto, a intervenção farmacológica principal, através das estatinas, tem sido largamente utilizada na diminuição da hipercolesterolemia (McTaggart & Jones, 2008). No entanto, apesar dos benefícios na redução do risco cardiovascular, o problema está longe de ser resolvido. Para além disso, o uso continuado das estatinas e outros fármacos hipocolesterolémicos apresentam diversos efeitos secundários, por vezes bastante significativos.

Assim, outros alvos têm sido explorados, destacando-se entre estes as HDL. Diversos estudos epidemiológicos evidenciam uma correlação inversa entre a ocorrência de DCV e os teores plasmáticos de HDL (Brewer, 2011), o que tem levado ao desenvolvimento de terapêuticas alternativas dirigidas para o aumento não só dos teores plasmáticos, mas também da funcionalidade destas lipoproteínas (Otocka-Kmieciak *et al.*, 2012).

Assim, nesta monografia, irão ser abordados os aspetos fundamentais das HDL relativamente à sua atividade protetora contra as DCV, nomeadamente, causadas pelo desenvolvimento de aterosclerose, fazendo-se previamente uma breve introdução às características das HDL, metabolismo lipídico, doença aterosclerótica e doenças relacionadas. Tendo por base as mais recentes descobertas no âmbito da funcionalidade destas partículas, irão também ser abordados os fatores principais que levam à disfuncionalidade das HDL e respetivas consequências, bem como os métodos de avaliação da funcionalidade. Adicionalmente, irão ser apresentadas as alternativas terapêuticas atualmente disponíveis e em desenvolvimento, direcionadas para o aumento do teor e/ou da funcionalidade das HDL, fazendo-se ainda uma abordagem comparativa da sua eficácia.

2. AS HDL: CARACTERIZAÇÃO E METABOLISMO

As HDL são agregados lipídicos e proteicos (lipoproteínas) de elevada densidade, constituídos por uma monocamada de fosfolípidos e colesterol livre e um core hidrofóbico contendo, essencialmente, colesterol esterificado (CE) e triglicéridos (TG) (Figura 1), distinguindo-se das LDL principalmente pela presença maioritária de apoproteínas ApoA (I e II), as quais constituem os constituintes estruturais principais destas lipoproteínas (Rye *et al.*, 1999).

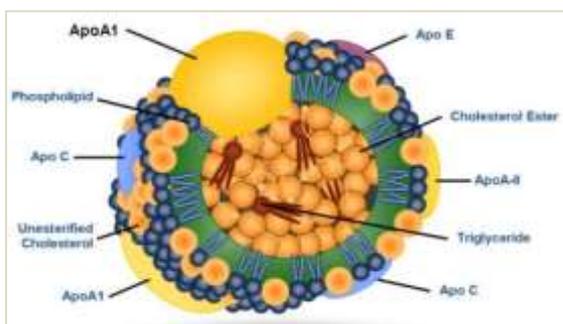


Figura 1: Constituição da partícula HDL. As HDL são lipoproteínas de alta densidade, maioritariamente constituídas por lípidos e apoproteínas (apo). Fonte imagem: https://www.healthtap.com/user_questions/41424

Podem distinguir-se diferentes subfrações de HDL, dependendo do método laboratorial utilizado. Por ultracentrifugação apenas é possível separar as HLD2 das HDL3. No entanto, quando sujeitas a eletroforese, as partículas de HDL subdividem-se num maior número de frações, de tamanho decrescente (HDL-2b, -2a, -3a, -3b e -3c). Os métodos imunológicos, por sua vez, permitem a separação das partículas contendo ApoA-I das contendo ApoA-II. A separação das diferentes partículas de HDL pode ainda ser realizada recorrendo a ultrafiltração e cromatografia, as quais permitem isolar as partículas de HDL nascentes/ pré- β -HDL (Otocka-Kmiecik *et al.*, 2012).

As apoproteínas (apo) são proteínas capazes de se ligar a lípidos, facilitando a sua solubilidade no sangue. As diferentes apoproteínas conferem às lipoproteínas diferentes características, interferindo no reconhecimento de recetores e na regulação de enzimas específicas. Adicionalmente, estas partículas constituem importantes marcadores de risco, permitindo prever e diagnosticar diversas doenças, tais como DCV e Alzheimer.

O colesterol, por sua vez, é uma molécula de extrema importância, estando envolvido na manutenção da estrutura das membranas bem como na síntese de hormonas esteróides, ácidos biliares e vitamina B. Pode circular no plasma sob duas formas distintas: o incorporado nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C), designado 'mau colesterol', que contribui para a formação da placa aterosclerótica e o incorporado nas HDL (HDL-C), chamado 'bom colesterol', o qual tem sido associado à prevenção das doenças cardiovasculares.

Assim sendo, torna-se essencial a distinção entre HDL-C e HDL, referindo-se o primeiro ao colesterol circulante (livre ou esterificado) associado a estas lipoproteínas, e o segundo às partículas que o transportam (Oldoni *et al.*, 2014).

Para uma melhor compreensão da atividade benéfica das HDL sobre as DCV é essencial conhecer o metabolismo dos lípidos bem como os processos envolvidos na formação das diversas lipoproteínas e o seu papel no desenvolvimento da aterosclerose (Figura 2).

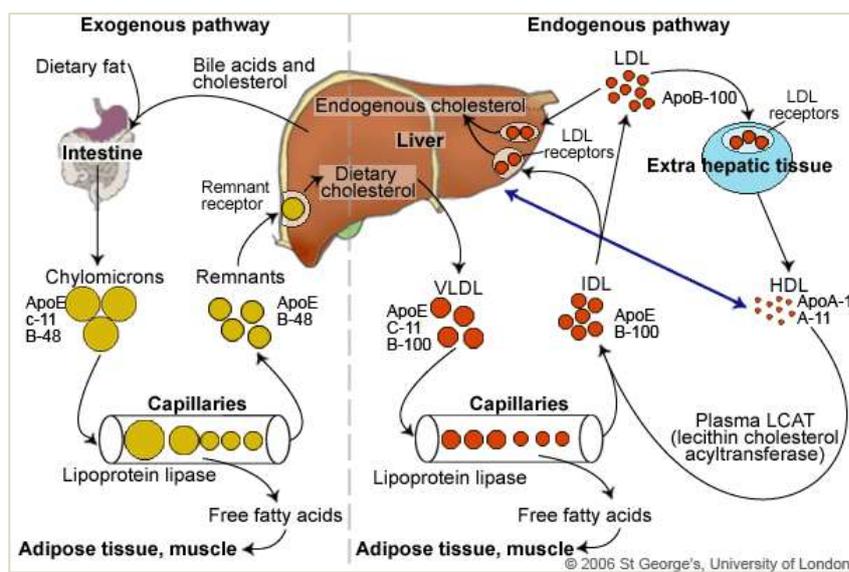


Figura 2: Metabolismo geral dos lípidos. O colesterol plasmático é transportado através de duas cascatas inter-relacionadas (endógena e exógena) que incluem lipoproteínas contendo apoB (quilomicron e LDL) e apoA (HDL) (Brewer, 2011). Fonte imagem: http://www.elu.sgu.ac.uk/rehash/guest/scorm/294/package/content/images/liver_lipoprotein.gif

Os quilomicron, partículas ricas em TGs segregadas a partir do intestino, têm a função de transportar os lípidos provenientes da dieta primariamente para o tecido adiposo e muscular, e secundariamente para o fígado e tecidos periféricos. Os TGs são hidrolisados pela lipoproteína lipase (LPL) e os produtos da hidrólise são transportados para as células do tecido adiposo e músculo, sendo os quilomicron remanescentes captados pelo fígado através dos recetores ApoB100/E, também designados recetores LDL.

As VLDL, lipoproteínas de muito baixa densidade, ricas em TGs, são segregadas pelo fígado, sendo também sujeitas à ação da LPL e deslipidificadas pela lipase hepática (LH), originando lipoproteínas de densidade intermédia – as IDL, as quais originam LDL pelo mesmo processo. As VLDL remanescentes, IDL e LDL são removidas do plasma por interação com o recetor hepático das LDL (Brewer, 2011).

No que diz respeito ao metabolismo geral das HDL, na Figura 3 apontam-se as principais vias metabólicas, assim como as diferentes subpopulações de HDL. A origem das HDL está na ApoA-I, que é segregada a partir do fígado e do intestino e interage com o

transportador membranar ABCA1, promovendo o efluxo de colesterol, convertendo-se assim numa partícula de ApoA-I pobre em lípidos. Posteriormente, estas partículas adquirem fosfolípidos e colesterol de células periféricas, tais como os macrófagos, transformando-se primariamente em partículas discoides – pré- β -HDL/HDL nascentes (Kardassis *et al.*, 2014).

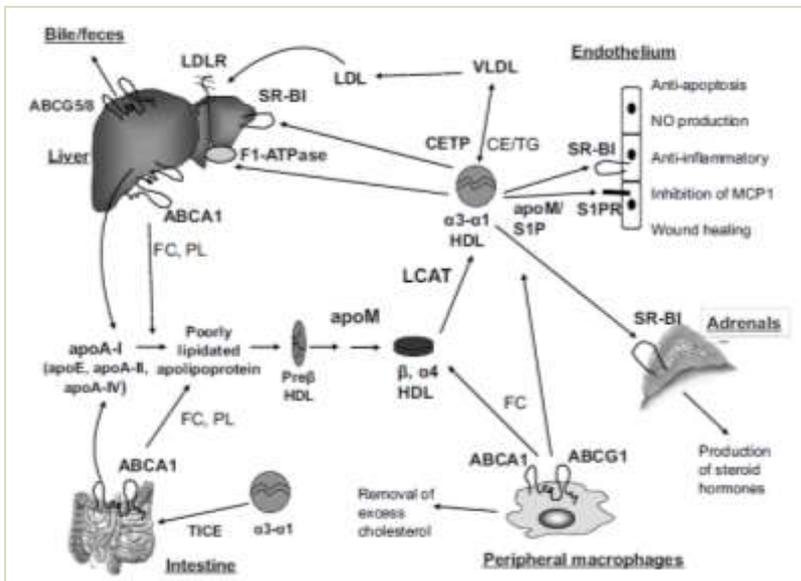


Figura 3: Metabolismo das HDL.

A figura apresenta as proteínas e receptores/transportadores envolvidas na biogénese, remodelação e catabolismo das HDL, bem como as diferentes subpopulações de HDL formadas (ApoA-I, pré- β , β , α), os órgãos/células envolvidos (fígado, intestino, macrófagos, endotélio e supra-renais) e a ação anti-aterogénica das HDL sobre cada um destes (Kardassis *et al.*, 2014).

Secundariamente, as HDL nascentes sofrem maturação através da esterificação do colesterol da monocamada, catalisada pela lecitina-colesterol acil-transferase (LCAT), enzima que requer ApoA-I como co-fator (Oldoni *et al.*, 2014). Uma vez esterificado, o colesterol é transferido para o core hidrofóbico da partícula, ficando as HDL aptas a receber mais colesterol livre intracelular.

Após esterificação pela LCAT, o colesterol contido nas α HDL pode ser transportado para o fígado através de duas vias distintas. A primeira via envolve a transferência do colesterol esterificado (CE) para as lipoproteínas contendo ApoB (em troca de TGs), mediada pelas CETP. A partícula de HDL enriquecida com TGs é suscetível a lipólise, sendo rapidamente catabolizada. A outra via diz respeito ao transporte direto do HDL-C para a fígado mediado pelo transportador SR-BI. Esta segunda via é seletiva e permite a reciclagem da partícula de HDL, a qual se encontra depois disponível para captar mais colesterol (ver Rader & Hovingh, 2014).

3. ATROSCLOROSE E MECANISMOS SUBJACENTES

A aterosclerose é uma doença inflamatória crónica, de baixo nível, das artérias de médio e de grande calibre caracterizada pela formação de placas constituídas por núcleos

necróticos, regiões calcificadas, lípidos modificados, células musculares inflamadas, células endoteliais, leucócitos e células esponjosas (Galkina & Ley, 2009).

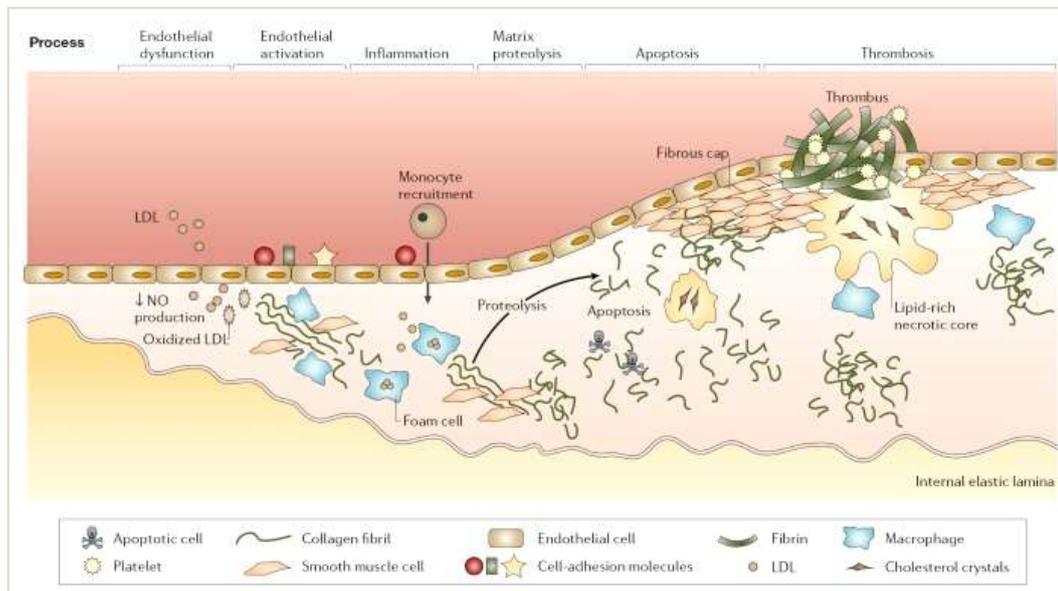


Figura 4: Fases do desenvolvimento da placa aterosclerótica. A acumulação de lípidos na íntima e sua oxidação desencadeiam uma resposta inflamatória, havendo recrutamento de monócitos ao local. Os macrófagos, ao captar as LDL oxidadas, aumentam o seu teor em colesterol, transformando-se em células esponjosas, as quais acabam por formar estrias gordas. A contínua acumulação de colesterol por estas células e a sua deposição nas estrias gordas acaba por conduzir, a longo prazo, a um processo de necrose com libertação do conteúdo celular, formando o chamado núcleo necrótico. Em estados avançados, poderá ocorrer a rutura do vaso e consequente formação de um trombo devido à acumulação de plaquetas no local (Choudhury *et al.*, 2004).

O processo aterosclerótico (Figura 4) inicia-se com a acumulação de lípidos (maioritariamente provenientes das LDL) na matriz extracelular do espaço subendotelial e posterior oxidação dos mesmos por espécies químicas reativas derivadas do oxigênio e do azoto, segregadas pelas células endoteliais. A hipercolesterolemia associada a LDL agrava a acumulação e o tempo de residência de LDL nesse espaço, acelerando a sua oxidação. Este processo desencadeia uma resposta inflamatória, a qual se traduz no recrutamento de monócitos da corrente sanguínea que se ligam às células endoteliais entrando na íntima onde, por ação de moléculas produzidas pelo endotélio, são convertidos em macrófagos (Berliner *et al.*, 1995). Estes, através dos seus recetores “scavenger”, captam de modo desregulado as LDL extensamente oxidadas e vão acumulando lípidos no seu interior, principalmente colesterol, transformando-se em células esponjosas. A acumulação de células esponjosas leva à formação de estrias gordas que podem posteriormente originar a placa aterosclerótica. Esta é inicialmente protegida por uma cápsula fibrosa resultante, em parte, da migração de células do músculo liso da parede celular para a zona da íntima. O contínuo crescimento da placa acaba por diminuir progressivamente o lúmen da artéria, reduzindo assim o fluxo sanguíneo. Adicionalmente, pode dar-se a deposição de cálcio, tornando as paredes arteriais inflexíveis. O aumento progressivo da pressão sanguínea pode danificar a

cápsula fibrosa, a qual pode romper, resultando num trombo. Dependendo da localização do bloqueio, este poderá conduzir a diversos problemas tais como AVCs ou EAMs, os quais constituem as principais sequelas clínicas da aterosclerose (Choudhury *et al.*, 2004).

De referir, que as DCV são responsáveis por mais de 17.3 milhões de mortes por ano, constituindo umas das principais causas de morte no mundo (Figura 5). No entanto, o conceito de DCV inclui inúmeras patologias do coração e dos vasos sanguíneos, estando apenas parte destas associadas à aterosclerose, tais como doença arterial coronária (CAD), AVC, hipertensão e doença vascular periférica.

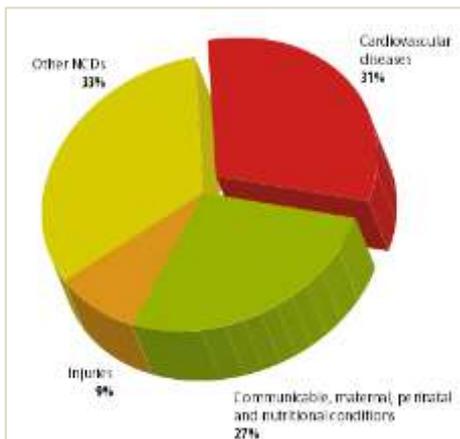


Figura 5: Distribuição mundial das principais causas de morte. Doenças cardiovasculares (31%), lesões (9%), condições genéticas e nutricionais (27%), doenças não cardiovasculares (33%). Fonte imagem: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf?ua=1

4. MECANISMOS DE AÇÃO DAS HDL NA PROTEÇÃO CONTRA AS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

4.1. Efluxo de colesterol/ Transporte reverso

Ao conceito de Transporte Reverso do Colesterol, no contexto da prevenção da aterosclerose, está fortemente associada a capacidade das HDL de remoção do excesso de colesterol dos macrófagos/células esponjosas, transportando-o de volta para o fígado, onde pode ser armazenado e utilizado para síntese de hormonas ou removido do organismo através da bília pelo trato gastrointestinal, conforme referido anteriormente (Figura 3).

No entanto, existem diversos mecanismos pelos quais se efetua o efluxo do colesterol dos macrófagos para as HDL, consoante o conteúdo em colesterol das mesmas, como se evidencia na Figura 6. O transportador responsável pelo efluxo de colesterol para as HDL nascentes/ β HDL é o ABCA1, sendo considerado o principal fator de regulação do mesmo. As partículas de HDL maduras / α HDL, por sua vez, ligam-se ao transportador ABCG1 e ao recetor SR-B1. Este último possui a capacidade de transportar colesterol para dentro ou para fora da célula dependendo do conteúdo de colesterol intracelular. Para além

destes sistemas de transporte ativo, as α HDL pode também captar colesterol a partir de um processo não específico de difusão passiva (ver Brewer, 2011).

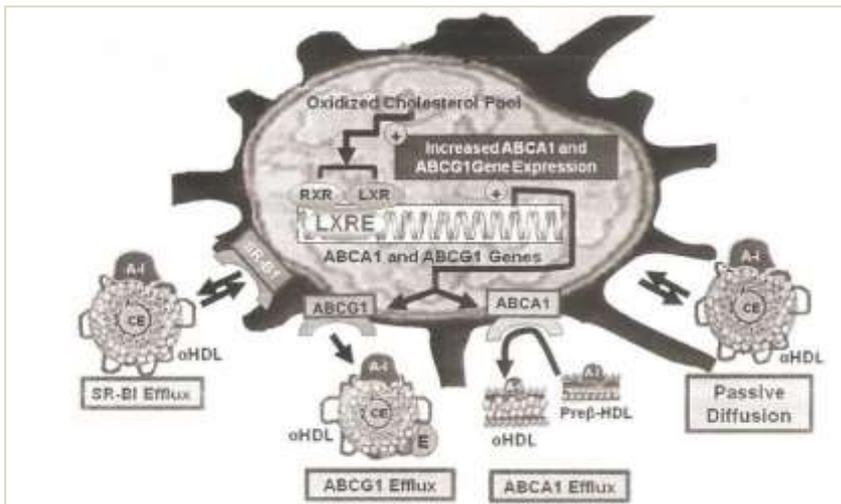


Figura 6: Principais vias do efluxo de colesterol. As pre- β -HDL captam colesterol dos macrófagos a partir do transportador ABCA1. As α HDL, por sua vez, captam colesterol através dos transportadores SR-BI e ABCG1 ou por difusão passiva (Brewer, 2011).

4.2. Ação Anti-inflamatória

Tal como anteriormente referido, a inflamação constitui um fator crítico na patogênese da aterosclerose, caracterizando-se pela infiltração de monócitos e macrófagos na parede arterial, bem como teores elevados de marcadores inflamatórios.

A inibição da expressão das moléculas de adesão tais como a VCAM-I, ICAM-I e E-selectina, bem como a neutralização das propriedades pro-inflamatórias da proteína C reativa (CRP) constituem os mecanismos principais através dos quais as HDL exercem a sua ação anti-inflamatória, prevenindo assim o desenvolvimento e a progressão da lesão aterosclerótica (Barter *et al.*, 2004).

4.3. Ação Antitrombótica e Profibrinolítica

Em estádios avançados da doença, o desenvolvimento da placa aterosclerótica pode conduzir à oclusão parcial ou total da artéria, originando eventuais AVCs ou EAMs.

As HDL desempenham uma ação essencial na prevenção do desenvolvimento de trombos, uma vez que inibem a ativação das plaquetas e reduzem a agregação plaquetária, a ligação do fibrinogénio e a secreção de tromboxano A.

Estes efeitos inibitórios são mediados pelo ácido araquidónico, cedido às células endoteliais pelas HDL. Este conduz à produção de prostaciclina (PGI_2), a qual possui um papel inibidor da ativação plaquetária bem como uma ação vasodilatadora (ver Otocka-Kmieciak *et al.*, 2012).

A ação profibrinolítica das HDL deve-se, essencialmente, à sua ação inibitória sobre a síntese do inibidor da ativação do plasminogénio (PAI-I) bem como à estimulação da síntese de plasmina, a qual leva à dissolução do trombo. Esta ação é, no entanto, exclusiva das HDL não alteradas por processos oxidativos, sendo que as HDL oxidadas promovem o efeito oposto, inibindo a fibrinólise (Mineo *et al.*, 2006).

4.4. Ação Antioxidante

Tal como anteriormente referido, a oxidação das LDL conduz à sua rápida incorporação pelos macrófagos através do recetor *scavenger*/CD36 (SR-BI) no espaço subendotelial, levando à formação de células esponjosas e consequente ativação do processo inflamatório. As HDL podem atenuar o processo de formação da placa aterosclerótica também através da ação protetora contra a oxidação destas lipoproteínas conferida pela ApoA-I e enzimas antioxidantes relacionadas, tais como Lp-PLA2, LCAT e GSPx (Podrez, 2010).

Adicionalmente, as HDL possuem a capacidade de ligar e remover os hidroperóxidos lipídicos e os produtos avançados da oxidação (ver Besler *et al.*, 2012), os quais são posteriormente hidrolisados pela paraoxonase I (PON1) e pelo fator ativador de plaquetas-acetil-hidrolase (PAF-AH) associados à partícula de HDL, protegendo as células endoteliais do processo infamatório (ver Brewer, 2011).

4.5. Produção endotelial de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) desempenha um papel fundamental no endotélio e no espaço subendotelial uma vez que, para além de regular o tónus e a estrutura vascular, apresenta efeitos antitrombótico, anticoagulante, anti-inflamatório e profibrinolítico.

Diversos estudos experimentais têm vindo a demonstrar a capacidade das HDL para modificar a expressão e a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), levando à estimulação da produção de NO, podendo este processo desenrolar-se através de diversos mecanismos.

Estudos iniciais apontaram a prevenção dos efeitos nocivos das LDL oxidadas sobre a eNOS como principal mecanismo de ação das HDL sobre a produção de NO. No entanto, estudos posteriores demonstraram a capacidade de estimulação direta da produção de NO mediada pelas HDL através da sua ligação ao recetor endotelial SR-BI. Esta ligação desencadeia a ativação da proteína cinase B que, por sua vez, estimula a fosforilação do resíduo de serina na eNOS conduzindo assim à sua ativação e consequente produção de NO (ver Besler *et al.*, 2012).

No entanto, a ligação das HDL ao recetor SR-BI através da ApoA-I (ligando major) não constitui o único mecanismo de estimulação da produção de NO pelas HDL, sendo esta também induzida pela ligação de fosfolípidos associados às HDL, tais como esfingosilfosforilcolina, esfingosina-1-fosfato (SIP) e liso-sulfatídeo, ao recetor esfingosina-1-fosfato 3 (SIP3).

Estes dois mecanismos de ligação das HDL encontram-se relacionados, uma vez que a ligação da ApoA-I ao recetor SR-BI cria a proximidade espacial necessária para que ocorra a estimulação do recetor SIP3 pelos fosfolípidos, desencadeando cascatas de sinalização reguladoras da função vascular (Nofer *et al.*, 2004).

Um outro mecanismo sugerido para a estimulação de produção de NO pelas HDL envolve o efluxo de oxisteróis mediado pelos transportadores ABCG1. Uma vez que a produção de espécies reativas de oxigénio induzida pelo 7-cetosterol conduz à rutura do dímero da eNOS, a remoção destas espécies por parte das HDL restaura a atividade desta enzima, preservando a função endotelial (Terasaka *et al.*, 2010).

4.6. Migração endotelial de proteínas

As HDL servem também de veículo de transporte de diversas proteínas fisiologicamente relevantes na inibição do processo aterosclerótico, tal como a SIP (Figura 7), estimulando a vasodilatação e a migração celular endotelial e inibindo a adesão de moléculas, a inflamação e a apoptose (ver Brewer, 2011).

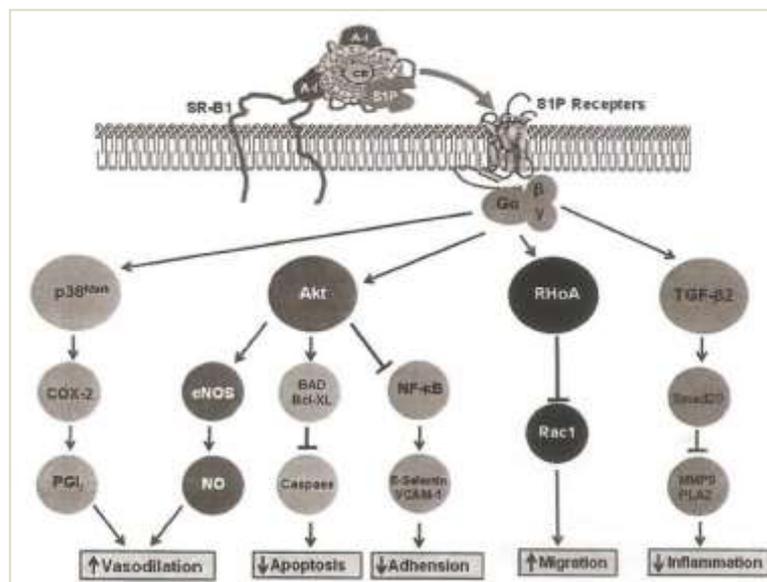


Figura 7: Transporte da esfingosina-1-fosfato (SIP) mediado pelas HDL. As HDL transportam a SIP, a qual, ao ligar-se aos seus recetores endoteliais e das células musculares, desencadeia cascatas de sinalização, promovendo a vasodilatação e a migração celular e inibindo a apoptose, as moléculas de adesão e processo o inflamatório (ver Brewer, 2011).

5. HDL DISFUNCIONAL

A percepção de que um grande número de DCV ocorriam em indivíduos com valores normais de LDL-C e HDL-C, levou a concluir que a composição quantitativa em lipoproteínas não deve ser considerada, por si só, como um indicador fiável do risco cardiovascular.

Assim sendo, o conceito de '*HDL hypothesis*', que pressupõe que um aumento dos teores de HDL levará a uma redução deste risco, tem vindo a ser substituído pelo conceito de '*HDL function hypothesis*', o qual tem em consideração as propriedades qualitativas das HDL, tais como o seu tamanho, forma, carga e antigenicidade (ver Otocka-Kmiecik *et al.*, 2012).

Tem sido evidenciado que nem sempre o aumento do número de partículas de HDL medido através do conteúdo em colesterol é benéfico, em particular na presença de alguns estados patológicos ou deficiências genéticas, levando a concluir que diversos fatores podem modificar a natureza das partículas de HDL, tornando-as pro-aterogénicas.

Em contraste com as HDL "normais", as HDL pro-aterogénicas apresentam propriedades pró-inflamatórias e uma atividade antioxidante e capacidade de efluxo bastante reduzidas, para além de dificuldades quer no transporte de colesterol esterificado para o fígado, quer na estimulação da produção de NO.

Diversos fatores podem conduzir ao aparecimento de HDL pro-aterogénicas, tais como alterações genéticas tanto na ApoA-I como no transportador ABCA1 ou na enzima LCAT (ver Otocka-Kmiecik *et al.*, 2012) (Tabela 1) ou, ainda, estados patológicos como diabetes, inflamação ou *stress* oxidativo (ver Besler *et al.*, 2012).

Múltiplos mecanismos dependentes de estados inflamatórios têm sido indicados como estando envolvidos na génese das HDL disfuncionais, tal como Otocka-Kmiecik e colaboradores reportam num trabalho de revisão de 2012 (Otocka-Kmiecik *et al.*, 2012).

Neste contexto, destaca-se o papel da mieloperoxidase (MPO), uma hemoproteína libertada aquando da desgranulação dos neutrófilos e monócitos, que demonstrou alterar a função da ApoA-I por modificação oxidativa, prejudicando a sua interação com o transportador ABCA1. Consequentemente, o efluxo de colesterol e a capacidade das HDL para ligar lípidos são diminuídos, ficando reduzida a formação de partículas de HDL estáveis e esféricas. Adicionalmente, a MPO leva à ativação das metaloproteinases e prejudica a capacidade de estimulação de produção de NO mediada pelas HDL (Zheng *et al.*, 2004).

Tabela 1: Defeitos genéticos (mutações, deleções e sobre-expressão) da ApoA1, ABCA1, LCAT E SR-BI, que alteram a funcionalidade das HDL (ver Besler *et al.*, 2012)

	Defeito genético	Consequências
ApoA-1	Mutações	Teores reduzidos de HDL-C, função endotelial prejudicada, IMT aumentada, amiloidose, desenvolvimento acelerado de aterosclerose
	Ausência	Teores reduzidos de HDL-C, lesão aterosclerótica aumentada
ABCA1	Mutações	Teores reduzidos de HDL-C, acumulação de macrófagos no espaço subendotelial, efluxo reduzido, risco prematuro de CAD
	Ausência total	Hipocolesterolémia, efeito anti-aterogénico
	Ausência nos macrófagos	Desenvolvimento aterosclerótico acelerado
	Sobre-expressão sistémica	Efeito anti-aterogénico
	Sobre-expressão hepática	Desenvolvimento acelerado de aterosclerose
LCAT	Mutações	Inconclusivo
SR-BI	Sobre-expressão	Aumento RCT, redução teores HDL
	Ausência	Aterosclerose aumentada, aumento teores HDL
	Mutação P279S	Teores aumentados de HDL, efluxo reduzido, <i>uptake</i> hepático de CE reduzido

Avaliação da funcionalidade das HDL

Existem vários métodos disponíveis para a avaliação da funcionalidade das HDL, nas suas diversas “vertentes”, podendo esta ser realizada através da medição das suas propriedades anti-inflamatórias ou das suas propriedades antioxidantes.

Apesar de ser considerado um bom marcador preditivo do risco cardiovascular, os teores de MPO não mostram relação direta com os teores plasmáticos de HDL disfuncional. Porém, a realização de ensaios imunológicos baseados na identificação de resíduos específicos de ApoA-1 gerados por oxidação catalisada pela MPO constitui também um meio promissor de investigação das HDL disfuncionais (ver Otocka-Kmieciak *et al.*, 2012).

Mais recentemente têm surgido novos métodos de deteção de HDL disfuncionais, tal como reportado por Jang e colaboradores (Jang *et al.*, 2011).

De referir ainda a preocupação evidenciada na literatura de que os testes para avaliação da funcionalidade das HDL deverão, tendencialmente, apresentar maior simplicidade e reprodutibilidade, bem como uma boa correlação com os testes de avaliação da função coronária (Rader & Hovingh, 2014).

6. TERAPÊUTICA DIRIGIDA AOS AUMENTOS DO TEOR PLASMÁTICO E/OU DA FUNCIONALIDADE DAS HDL

6.1. As terapêuticas iniciais

6.1.1. Niacina

A niacina, também designada ácido nicotínico, é uma vitamina do complexo B que tem vindo a ser utilizada pela sua ação sobre o sistema digestivo (conversão do alimentos em energia), a pele e o sistema nervoso.

Nos últimos cinquenta anos a niacina tem sido usada como opção para o tratamento da hipercolesterolemia e doenças associadas, na dosagem de 1-3 gramas/dia, visando aumentar os teores de HDL (Rader & Hovingh, 2014).

O principal mecanismo de ação da niacina é a supressão da hidrólise dos TGs armazenados no tecido adiposo e a consequente redução dos teores plasmáticos de ácidos gordos livres. Uma vez que estes constituem um dos principais substratos essenciais para a síntese de TGs no fígado, a niacina leva à redução dos teores das lipoproteínas que incorporam estes compostos, i.e. VLDL e, consequentemente, LDL, cuja formação advém das VLDL. Devido à já referida relação inversa entre os teores de TGs e de HDL-C, a redução dos TGs induzida pela niacina aumenta os teores plasmáticos de HDL-C em, aproximadamente, 35% (Chapman *et al.*, 2004).

Para além disto, a niacina altera também as propriedades qualitativas das HDL, estimulando a retenção de colesterol esterificado, o aumento do tamanho das partículas e o transporte reverso do colesterol (RCT) através do transportador ABCA1 (ver Ostocka-Kmiecik *et al.*, 2012).

Apesar de promover efeitos anti-inflamatórios, a administração de agonistas do recetor nicotínico GRP109A demonstrou não ter efeito nos teores de HDL-C, LDL-C ou TG, sugerindo que a niacina poderá modular os teores plasmáticos de lípidos através de mecanismos independentes deste recetor (Lauring *et al.*, 2012).

A ativação do recetor nicotínico GRP109A a nível da pele promove a síntese de PGD2 e PGE2 que, por sua vez, se ligam ao recetor DP₁ e EP2/4, respetivamente, induzindo vasodilatação capilar que se reflete em vermelhidão cutânea (Dunbar & Gelfand, 2010). Assim sendo, a niacina encontra-se frequentemente associada a um inibidor da ativação do recetor DP1 – laropipranto - por forma a reduzir esses efeitos secundários a nível cutâneo.

Neste contexto, novos derivados do ácido nicotínico têm vindo a ser desenvolvidos, tais como a nicotinamida, procurando reduzir tais efeitos secundários (ver Otocka-Kmiecik *et al.*, 2012).

6.1.2. Estatinas

As estatinas exercem o seu mecanismo de ação através da inibição da HMG-CoA redutase, reduzindo assim o teor em lipoproteínas contendo ApoB.

No entanto, estes fármacos aumentam também os teores de HDL-C (maioritariamente de grandes dimensões) em cerca de 5-10%, induzindo a produção de ApoA-I de PON1, a qual é responsável pela atividade antioxidante e pelo efluxo de colesterol por estimulação do transportador ABCA1 (Otocka-Kmiecik *et al.*, 2012).

Pensa-se que o mecanismo através da qual as estatinas elevam os teores de HDL se relaciona com a diminuição da atividade da CETP, uma vez que, havendo uma reduzida quantidade de lipoproteínas contendo ApoB, as trocas CE/TG entre as HDL e estas lipoproteínas são naturalmente diminuídas (McTaggart & Jones, 2008).

6.1.3. Fibratos

A administração de fibratos no contexto do tratamento da hipercolesterolemia visa a estimular a atividade da LPL e a modificar o conteúdo plasmático em lipoproteínas, aumentando o teor em ApoA-I e diminuindo o teor em ApoC-III (inibidor da LPL).

Estes efeitos conduzem a um aumento do catabolismo das lipoproteínas ricas em TGs, aumentando consequentemente os teores de HDL-C.

Outros efeitos benéficos dos fibratos sobre o desenvolvimento da aterosclerose incluem a supressão da inflamação através da redução dos teores de CRP e o aumento da proporção de HDL de pequenas dimensões, as quais constituem melhores aceptadores de colesterol (Després *et al.*, 2004).

6.1.4. Ezetimiba

Apesar da administração de ezetimiba ter demonstrado não influenciar nos teores de HDL-C ou de ApoA-I, esta resulta numa diminuição considerável das HDL-3 bem como um aumento da PON1 e da Lp-PLA2 (Nakou *et al.*, 2008).

6.1.5. Tiazolidinedionas

As tiazolidinedionas comportam-se como agonistas dos recetores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs), os quais desempenham um papel fundamental do metabolismo dos lípidos, aumentando os teores de HDL-C e o tamanho médio das partículas de HDL.

A **pioglitazona** aumenta o teor de HDL de grande e média dimensão e diminui a concentração de HDL de pequena dimensão, apresentando efeito nulo nos teores de ApoA-I. Adicionalmente, demonstrou também reduzir o rácio TG/CE nas HDL, podendo os seus efeitos benéficos estar relacionados com o aumento do teor em adiponectina.

A **rosiglitazona**, por sua vez, reduz as HDL de pequena e grande dimensão e aumenta as de média dimensão, conduzindo à elevação do rácio HDL-3b/HDL-2b.

Comparando estes dois fármacos, concluímos que a pioglitazona (14,9%) é mais eficaz no aumento das HDL do que a rosiglitazona (7,8%) (Deeg *et al.*, 2007).

O quadro seguinte (Tabela II) faz uma abordagem comparativa de alguns dos fármacos mais utilizados no aumento dos teores de HDL-C quando à sua eficácia (%).

Tabela II: Eficácia de fármacos no aumento dos teores de colesterol HDL (HDL-C). Inibidores da CETP (30-138%), Niacina ($\leq 35\%$), Fibratos (5-10%), Estatinas (3-15%) e Tiazolidinedionas (7-15%) (Otocka-Kmieciak *et al.*, 2012).

Drug intervention	HDL-C increase (%)
CETP inhibitors	30-138
Niacin	≤ 35
Fibrates	5-20
Statins	3-15
Thiazolidinediones	7-15

Alguns autores distinguem a terapêutica de aumento dos teores/funcionalidade das HDL em dois grupos – a terapia aguda, direcionada essencialmente para o aumento dos teores plasmáticos de pre β -HDL através das infusões anteriormente referidas; e a terapia crónica, a qual consiste em fármacos de administração oral que possam ser usados por tempo longo/indeterminado, tais como a niacina e os inibidores da CETP (Brewer, 2011).

6.2. **Novos alvos terapêuticos**

6.2.1. Inibidores da CETP

O interesse farmacológico na inibição da proteína plasmática transferidora do colesterol esterificado (CETP) como abordagem terapêutica de aumento dos teores de HDL-C surgiu na sequência da observação de que a deficiência genética desta proteína

estava frequentemente associada a concentrações elevadas de HDL-C (Japão) (ver Besler et al., 2012).

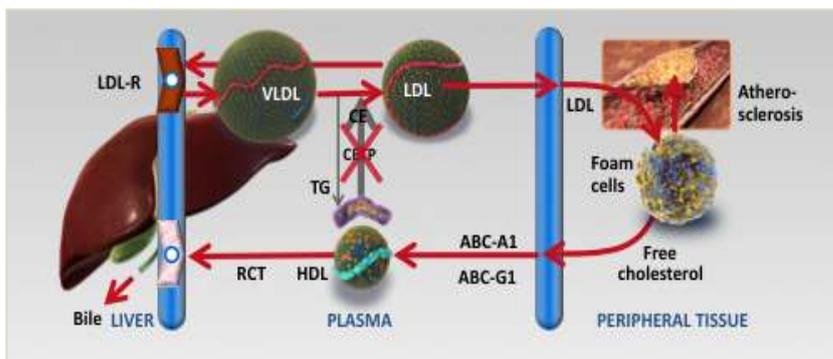


Figura 8: Mecanismo de ação dos inibidores da CETP. As CETP medeiam a troca de CE/TGs entre as HDL e as VLDL/ LDL, constituindo assim uma alternativa ao transporte reverso do colesterol. Fonte imagem: <http://img.medscape.com/article/734/623/Slide2.png>

Tal como mencionado anteriormente, a CETP medeia a troca de colesterol esterificado e triglicéridos entre as HDL e as lipoproteínas contendo ApoB100 (VLDL, LDL) constituindo, assim, uma alternativa ao retorno de CE para o fígado (Figura 8).

Assim sendo, a inibição desta proteína plasmática leva a um aumento do HDL-C plasmático, bem como a uma diminuição do LDL-C. Adicionalmente, os inibidores das CETP têm impacto na composição qualitativa das HDL, aumentando a razão CE/TG, o que leva a um melhoramento da sua capacidade antioxidante – redução dos teores de LDL oxidadas (ver Otocka-Kmiecik et al., 2012).

O primeiro inibidor das CETP testado em humanos – **torcetrapib** – demonstrou elevar substancialmente os teores de HDL-C até 90% e reduzir o LDL-C até 40% (ver Brewer, 2011). Este estudo (ILLUMUNATE) foi no entanto terminado prematuramente devido ao aumento dos eventos cardiovasculares e mortalidade em doentes tratados com atorvastatina + torcetrapib, o qual se concluiu ser causado por toxicidade *off-target*, nomeadamente produção aumentada de aldosterona e aumento da pressão arterial. Adicionalmente, o torcetrapib em comparação com a atorvastatina isolada demonstrou aumentar o número de mortes por causas não vasculares, tais como cancro ou inflamação, possivelmente devidas a alterações das funções imune/inflamatórias das HDL (Barter, 2009). Observou-se ainda o efeito inibidor deste fármaco na produção de NO, bem como na produção de espécies reativas de oxigénio.

Uma vez que se concluiu que a toxicidade *off-target* do torcetrapib se devia ao próprio fármaco, foram realizados diversos outros ensaios para testar outros inibidores da CETP desprovidos destes efeitos – dalcetrapib, anacetrapib e evacetrapib.

O **dalcetrapib** – segundo inibidor da CETP a chegar à fase 3 do ensaio clínico – falhou devido à fraca capacidade de redução do risco cardiovascular. No entanto, os dois últimos a ser testados – **anacetrapib** e **evacetrapib** (Otocka-Kmiecik et al., 2012) – demonstraram

aumentar consideravelmente mais os teores de HDL-C do que o anterior, reduzindo também os teores de LDL-C e de Lp(a) (Larach *et al.*, 2012) (Tabela III).

Tabela III: Eficácia comparativa dos inibidores das CETP. Os inibidores mais recentes das CETP (anacetrapib e evacetrapib) demonstraram a maior eficácia tanto no aumento das do HDL-C como na redução do LDL-C, não apresentando toxicidade *off-target*.

	Aumento HDL-C (%)	Redução LDL-C (%)
Torcetrapib	até 90 %	até 40%
Dalcetrapib	até 31%	sem efeito
Anacetrapib	até 138%	até 36%
Evacetrapib	até 129%	até 36%

6.2.2. Infusões de HDL recombinante contendo ApoA-I

Tal como já foi referido, a ApoA-I constitui a proteína mais abundante das HDL, promovendo o efluxo de colesterol a partir dos macrófagos através da sua ligação ao recetor membranar ABCA1. Assim sendo, poder-se-á inferir que o aumento desta proteína irá promover o transporte reverso do colesterol, diminuir a inflamação e estabilizar a placa aterosclerótica.

Uma das possíveis estratégias envolve a incubação *in vitro* de ApoA-I, isolada a partir de plasma humano, com fosfatidilcolina derivada da soja, originando HDL recombinante, tendo em vista a prevenção do catabolismo e o favorecimento da sua farmacocinética. Desta forma procura-se simular o aumento das HDL nascentes em circulação, aumentando o transporte reverso do colesterol. No mesmo sentido, desenvolveram-se estratégias envolvendo o recurso a formas mutadas de ApoA-I ou peptídeos miméticos ApoA-I. Neste âmbito, a ApoA-I Milano, uma mutação anti-aterogénica natural da ApoA-I por substituição da cisteína pela arginina no aminoácido 173, tem sido utilizada em complexos com fosfolípidos (ver Larach *et al.*, 2012), embora a sua eficácia tenha ficado aquém do esperado.

Uma outra abordagem consiste na infusão de HDL autólogo deslipidificado. Este é inicialmente colhido do plasma humano por aferese, sendo depois deslipidificado com solventes orgânicos (conversão de α HDL em pre- β -HDL) e re-administrado ao doente (Sacks *et al.*, 2009).

6.2.3. Peptídeos miméticos da ApoA-I

Como anteriormente referido, os efeitos benéficos das HDL devem-se em grande parte à sua proteína principal, a ApoA-I. No entanto, a administração intravenosa desta

proteína apresenta algumas limitações devido à sua grande dimensão e aos custos associados.

Assim sendo, surgiu necessidade de obter partículas de menor dimensão, fáceis de produzir e menos dispendiosas – peptídeos miméticos da ApoA-I (Sherman *et al.*, 2010).

Estes peptídeos possuem uma afinidade aumentada para fosfolípidos e ácidos gordos oxidados, o que lhes confere capacidade de os remover eficazmente, normalizando assim a composição e a função das lipoproteínas (Imaizumi *et al.*, 2011). Estas partículas possuem ainda a vantagem de não serem facilmente degradadas pelas peptidases no intestino, podendo por isso ser administrados oralmente (ver Otocka-Kmiecik *et al.*, 2012).

O primeiro peptídeo mimético a ser testado, em 1985, continha dois resíduos de fenilalanina, sendo assim designado de 2F. Este composto não foi no entanto capaz de reduzir significativamente a aterosclerose induzida num modelo animal. Assim, foram posteriormente escolhidos para análise dois peptídeos, o 4F e o 5F, contendo 4 e 5 resíduos de fenilalanina, respetivamente. O peptídeo 5F sintetizado a partir de L-aminoácidos (L-5F) demonstrou claramente proteger contra a aterosclerose induzida em modelo animal. O 4F sintetizado a partir de D-aminoácidos (D-4F), por sua vez, melhorou significativamente as propriedades anti-inflamatórias das HDL bem como a redução das lesões ateroscleróticas já formadas (Sherman *et al.*, 2010).

6.2.4. Regulação da produção endógena de ApoA-I

O RVX-208, uma molécula sintética de pequena dimensão, demonstrou promover a transcrição do gene ApoA-I, aumentando os teores plasmáticos desta proteína em aproximadamente 60% num modelo animal. No entanto, num ensaio clínico realizado, causou um aumento de apenas 10%, concluindo-se assim que esta abordagem não apresenta benefícios significativos na prevenção do desenvolvimento da placa aterosclerótica (Bailey *et al.*, 2010).

6.2.5. Regulação dos Recetores Hepáticos X

Os recetores hepáticos X (LXR) são recetores nucleares que se comportam como sensores de colesterol, regulando a expressão de genes envolvidos no seu metabolismo, podendo estimular a expressão de genes anti-aterogénicos, nomeadamente de ApoE, de ABCA1 e de LPL, ou inibir a expressão de genes pro-inflamatórios, em particular da COX-2, da IL-6 e da eNOS (Baranowski, 2008) (Figura 9).

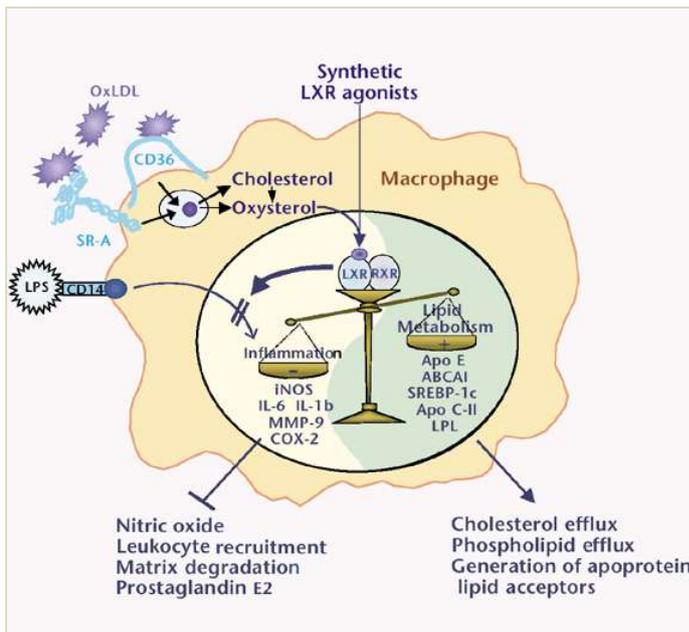


Figura 9: Regulação da inflamação e do metabolismo lipídico pelos receptores hepáticos X nos macrófagos. Os receptores LXR exercem uma dupla ação na proteção contra a aterosclerose, por estimulação de fatores anti-aterogênicos e inibição de fatores pró-inflamatórios.

Fonte imagem: <http://www.nature.com/nm/journal/v9/n2/images/nm0203-168-F1.gif>

Existem dois tipos de LXR: os LXR α , maioritariamente expressos no fígado, tecido adiposo, rim e macrófagos, e os LXR β , expressos ubiquamente. Apesar da proteção aterosclerótica pelos LXR ser essencialmente devida aos seus efeitos em células hematopoiéticas, alguns estudos têm vindo a demonstrar que os LXR podem exercer o seu efeito anti-aterogénico também noutras células, nomeadamente hepáticas, intestinais, endoteliais e musculares (Calkin & Tontonoz, 2010).

A ativação dos LXR por agonistas naturais (oxisteróis) ou sintéticos (Figura 10), promove a mobilização intracelular de colesterol, o seu efluxo via ABCA1 e ABCG1 e a produção de HDL, reduzindo o desenvolvimento aterosclerótico (ver Larach et al., 2012).

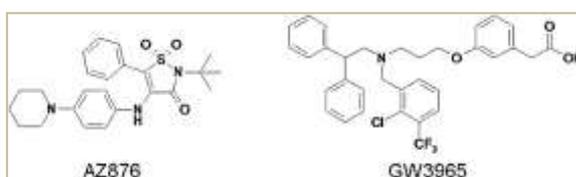


Figura 10: O AZ876 e o GW6340 são exemplos de agonistas sintéticos dos receptores hepáticos X. Fonte imagem: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3057293/>

6.2.6. Silenciamento do MiR-33

Os microRNAs são pequenas sequências não-codificantes que inibem a expressão genética. O MiR-33 é uma família de percursos de microRNAs que suprime especificamente a expressão dos transportadores ABCA1 e ABCG1 dos hepatócitos e dos macrófagos, reduzindo, conseqüentemente, os teores de HDL, já que inibe o efluxo intracelular de colesterol para as HDL nascentes.

Assim, o silenciamento do MiR-33 com um oligonucleótido *antisense* (ASO), administrado por via subcutânea, foi utilizado como estratégia terapêutica num modelo

animal de aterosclerose, tendo originado um aumento significativo dos teores de HDL-C, bem como na promoção do transporte reverso do colesterol e a regressão da placa aterosclerótica (ver Larach *et al.*, 2012).

6.2.7. Inibidores da Mieloperoxidase

A MPO é uma enzima que atua seletivamente sobre a ApoA-I, oxidando-a, o que resulta na inibição do efluxo de colesterol a partir dos macrófagos mediado pelo transportador ABCA1. Apesar da inibição desta enzima ter uma ação benéfica sobre o efluxo de colesterol, ela irá prejudicar também todas as suas restantes atividades. Uma alternativa terapêutica é a interferência com o seu local de ligação na ApoA-I, não influenciando assim as suas restantes funções de defesa inata, tais como proteção contra infecções e processos inflamatórios (Kutter *et al.*, 2000).

7. CONCLUSÃO

A utilização das HDL como alvo terapêutico das doenças cardiovasculares tem demonstrado alguma controvérsia, verificando-se ainda bastante heterogeneidade nos estudos relativos às suas funções ateroprotetoras.

Verificou-se, no entanto, que a administração de fármacos direcionados para o aumento dos teores plasmáticos/funcionalidade das HDL, em concomitância com a administração de estatinas, apresenta eficácia acrescida na redução do risco cardiovascular. Até ao momento, os inibidores da CETP são vistos como os fármacos mais eficazes, elevando os teores de HDL até 138%.

Os teores de HDL-C, por si só, representam uma medida insuficiente da capacidade anti-aterogénica das HDL, tendo-se concluído que a estrutura e metabolismo destas partículas constituem fatores críticos na previsão do risco cardiovascular. No entanto, a HDL *function hypothesis* está ainda em fase de estudo, aguardando por validação formal.

Futuramente, a terapêutica deverá ser direcionada para a prevenção da conversão das HDL nativas em HDL disfuncionais, devendo assim atingir-se uma maior eficácia. Além disso, espera-se também melhorar e desenvolver novos métodos de avaliação da sua funcionalidade, apostando na sua simplicidade e reprodutibilidade.

A abordagem das HDL como alvo terapêutico apresenta-se assim bastante promissora, sendo espectável a sua evolução no âmbito da prevenção das DCV e, possivelmente, a sua inclusão na terapêutica habitual de doentes com dislipidémia ou elevado risco cardiovascular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bailey, D., Jahagirdar, R., Gordon, A., Hafiane, A., Campbell, S., Chatur, S., Genest, J. (2010). RVX-208: a small molecule that increases apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein cholesterol in vitro and in vivo. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(23), 2580–9. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.02.035>
- Baranowski, M. (2008). Biological role of liver X receptors. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 59 Suppl 7, 31–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19258656>
- Barter, P. (2009). Lessons learned from the Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial. *The American Journal of Cardiology*, 104(10 Suppl), 10E–5E. <http://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.09.014>
- Barter, P. J., Nicholls, S., Rye, K.-A., Anantharamaiah, G. M., Navab, M., & Fogelman, A. M. (2004). Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation Research*, 95(8), 764–72. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000146094.59640.13>
- Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Luscis, A. J. (1995). Atherosclerosis: Basic Mechanisms : Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation*, 91(9), 2488–2496. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.91.9.2488>
- Besler, C., Lüscher, T. F., & Landmesser, U. (2012). Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Molecular Medicine*, 4(4), 251–268. <http://doi.org/10.1002/emmm.201200224>
- Brewer, H. B. (2011). The Evolving Role of HDL in the Treatment of High-Risk Patients with Cardiovascular Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(5), 1246–1257. <http://doi.org/10.1210/jc.2010-0163>
- Calkin, A. C., & Tontonoz, P. (2010). Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(8), 1513–8. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.191197>
- Chapman, M. J., Assmann, G., Fruchart, J.-C., Shepherd, J., & Sirtori, C. (2004). Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid--a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Current Medical Research and Opinion*, 20(8), 1253–68. <http://doi.org/10.1185/030079904125004402>
- Choudhury, R. P., Fuster, V., & Fayad, Z. a. (2004). Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(11), 913–925. <http://doi.org/10.1038/nrd1548>
- Deeg, M. A., Buse, J. B., Goldberg, R. B., Kendall, D. M., Zagar, A. J., Jacober, S. J., Tan, M. H. (2007). Pioglitazone and rosiglitazone have different effects on serum lipoprotein particle concentrations and sizes in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*, 30(10), 2458–64. <http://doi.org/10.2337/dc06-1903>

- Després, J.-P., Lemieux, I., & Robins, S. J. (2004). Role of fibric acid derivatives in the management of risk factors for coronary heart disease. *Drugs*, 64(19), 2177–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15456334>
- Dunbar, R. L., & Gelfand, J. M. (2010). Seeing red: Flushing out instigators of niacin-associated skin toxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 120(8), 2651–2655. <http://doi.org/10.1172/JCI44098>
- Galkina, E., & Ley, K. (2009). Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annual Review of Immunology*, 27, 165–97. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132620>
- Gaziano, T., Reddy, K. S., Paccaud, F., Horton, S., & Chaturvedi, V. (2006). Cardiovascular Disease. In *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 2nd Edition, Jamison, Breman, Measham, Alleyne, Claeson, Evans, Jha, Mills and Musgrove, Editors. World Bank (2006). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11767/>
- Imaizumi, S., Navab, M., Morgantini, C., Charles-Schoeman, C., Su, F., Gao, F., ... Reddy, S. T. (2011). Dysfunctional high-density lipoprotein and the potential of apolipoprotein A-I mimetic peptides to normalize the composition and function of lipoproteins. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 75(7), 1533–8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3625624&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jang, W., Shim, J., Lee, D.-Y., Dutta, P., Kim, J.-R., & Cho, K.-H. (2011). Rapid detection of dysfunctional high-density lipoproteins using isoelectric focusing-based microfluidic device to diagnose senescence-related disease. *Electrophoresis*, 32(23), 3415–23. <http://doi.org/10.1002/elps.201100361>
- Kardassis, D., Mosialou, I., Kanaki, M., Tiniakou, I., & Thymiakou, E. (2014). Metabolism of HDL and its Regulation, 2864–2880.
- Kutter, D., Devaquet, P., Vanderstocken, G., Paulus, J. M., Marchal, V., & Gothot, A. (2000). Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? *Acta Haematologica*, 104(1), 10–5. <http://doi.org/41062>
- Larach, D. B., deGoma, E. M., & Rader, D. J. (2012). Targeting high density lipoproteins in the prevention of cardiovascular disease? *Current Cardiology Reports*, 14(6), 684–91. <http://doi.org/10.1007/s11886-012-0317-3>
- Lauring, B., Taggart, A. K. P., Tata, J. R., Dunbar, R., Caro, L., Cheng, K., ... Plump, A. (2012). Niacin lipid efficacy is independent of both the niacin receptor GPR109A and free fatty acid suppression. *Science Translational Medicine*, 4(148), 148ra115. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003877>
- McTaggart, F., & Jones, P. (2008). Effects of statins on high-density lipoproteins: a potential contribution to cardiovascular benefit. *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 22(4), 321–38. <http://doi.org/10.1007/s10557-008-6113-z>
- Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J. H., & Shaul, P. W. (2006). Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation Research*, 98(11), 1352–64.

<http://doi.org/10.1161/01.RES.0000225982.01988.93>

- Nakou, E. S., Filippatos, T. D., Kiortsis, D. N., Derdemezis, C. S., Tselepis, A. D., Mikhailidis, D. P., & Elisaf, M. S. (2008). The effects of ezetimibe and orlistat, alone or in combination, on high-density lipoprotein (HDL) subclasses and HDL-associated enzyme activities in overweight and obese patients with hyperlipidaemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(18), 3151–8. <http://doi.org/10.1517/14656560802548430>
- Nofer, J.-R., van der Giet, M., Tölle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H. A., Levkau, B. (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor SIP3. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(4), 569–81. <http://doi.org/10.1172/JCI18004>
- Oldoni, F., Sinke, R. J., & Kuivenhoven, J. A. (2014). Mendelian disorders of high-density lipoprotein metabolism. *Circulation Research*, 114(1), 124–42. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300634>
- Otrocka-Kmiecik, A., Mikhailidis, D. P., Nicholls, S. J., Davidson, M., Rysz, J., & Banach, M. (2012). Dysfunctional HDL: A novel important diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease? *Progress in Lipid Research*, 51(4), 314–324. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.03.003>
- Podrez, E. A. (2010). Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 37(7), 719–25. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2010.05380.x>
- Rader, D. J., & Hovingh, G. K. (2014). HDL and cardiovascular disease. *The Lancet*, 384(9943), 618–625. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61217-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61217-4)
- Rye, K. A., Clay, M. A., & Barter, P. J. (1999). Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis*, 145(2), 227–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488948>
- Sacks, F. M., Rudel, L. L., Conner, A., Akeefe, H., Kostner, G., Baki, T., ... Brewer, H. B. (2009). Selective delipidation of plasma HDL enhances reverse cholesterol transport in vivo. *Journal of Lipid Research*, 50(5), 894–907. <http://doi.org/10.1194/jlr.M800622-JLR200>
- Sherman, C. B., Peterson, S. J., & Frishman, W. H. (2010). Apolipoprotein A-I mimetic peptides: a potential new therapy for the prevention of atherosclerosis. *Cardiology in Review*, 18(3), 141–7. <http://doi.org/10.1097/CRD.0b013e3181c4b508>
- Terasaka, N., Westerterp, M., Koetsveld, J., Fernández-Hernando, C., Yvan-Charvet, L., Wang, N., ... Tall, A. R. (2010). ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(11), 2219–25. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.213215>
- Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M.-L., Sun, M., Goormastic, M., Settle, M., ... Hazen, S. L. (2004). Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 529–41. <http://doi.org/10.1172/JCI21109>