

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

BRUNA STÉFANY BENTO DE SOUSA TELES

**ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PEQUENAS PARTÍCULAS DE
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) E A PROGRESSÃO DA
ATEROSCLEROSE CORONÁRIA EM ADULTOS
COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

BRASÍLIA

2026

BRUNA STÉFANY BENTO DE SOUSA TELES

**ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PEQUENAS PARTÍCULAS DE
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) E A PROGRESSÃO DA
ATEROSCLEROSE CORONÁRIA EM ADULTOS
COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas pelo
Programa de Pós-graduação em
Ciências Médicas da Universidade de
Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Sérgio Fernandes de Carvalho.

BRASÍLIA

2026

BRUNA STÉFANY BENTO DE SOUSA TELES

**ASSOCIAÇÃO ENTRE NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PEQUENAS PARTÍCULAS DE
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) E A PROGRESSÃO DA
ATEROSCLEROSE CORONÁRIA EM ADULTOS COM DIABETES MELLITUS
TIPO 2**

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas e aprovada em sua forma final pela banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Brasília, 27 de maio de 2026.

Prof. Dr. Luiz Sérgio Fernandes de Carvalho
(Orientador)
Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Alessandra Menezes Campos
Creighton University

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Gilson Roberto de Araújo
UNINTA - Itapipoca e Sobral - *Medical Affair da Science Valley Research Institute*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que em tudo tem me sustentado, convicta de que dele, por meio dele e para ele são todas as coisas.

À minha mãe, Arita, por seu amor incondicional e sua força inabalável.

Ao meu pai, Gleiton, que é meu modelo de intelectualidade e minha rocha.

Ao meu marido, André, meu grande amor, meu melhor amigo e meu incentivador diário.

À minha avó, Maria, que, embora não esteja mais neste plano, fez-me prometer a mim mesma nunca parar e nunca me contentar.

Ao meu avô, Drailton, que me ensinou que atitudes são mais importantes do que palavras.

Aos meus mestres, Dr. José Carlos Quináglia e Dr. Osório Rangel, por forjarem meu caráter como médica.

Ao meu professor Dr. Luiz Sérgio, que, além de meu querido orientador, foi um pai científico em minha trajetória.

À equipe do ELSA-Brasil, que me permitiu trabalhar com dados tão valiosos e cujo esforço tornou possível a realização desta tese.

Aos amigos e pacientes que lutaram o bom combate ao meu lado ao longo dos anos, minha gratidão.

RESUMO

Contexto: O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) impacta significativamente a progressão da aterosclerose coronária, com alta heterogeneidade. A resistência à insulina é etiológicamente relacionada a múltiplos fatores de risco que potencializam a aterogênese em graus variados. Objetivo: Para melhor compreender os fatores associados à incidência/progressão do cálcio arterial coronário (CAC), estudamos 4.331 indivíduos do ELSA-Brasil. Métodos: Indivíduos com DM2 apresentaram maiores taxas de incidência/progressão de CAC em comparação aos participantes sem diabetes. Entre 461 indivíduos com DM2, não usuários de estatinas e sem doença cardiovascular aterosclerótica (ASCVD) no início do estudo, 143 (31,0%) apresentaram incidência/progressão de CAC, e a concentração de pequenas partículas de lipoproteína de alta densidade (HDL) mostrou associação significativa com esses desfechos. Resultados: Maior concentração plasmática (3º tercil) de partículas de HDL com <8 nm (HDLp1) foi associada a maior chance de incidência/progressão de CAC (*odds ratio* [OR] = 2,40; IC 95%: 1,32–3,40; $p < 0,001$) em comparação ao 1º tercil, correspondendo a um aumento aproximado de 140%. A inclusão de HDLp1 também foi associada a uma melhora líquida de reclassificação de 13,6% (NRI = 0,136; IC 95%: 0,028–0,188; $p = 0,004$), indicando melhor classificação do risco de incidência/progressão de CAC. Conclusão: A concentração de HDLp1 demonstra associação significativa com a incidência/progressão de CAC em indivíduos com DM2.

Palavras-chave: HDL, Aterosclerose, Diabetes Mellitus Tipo 2, Escore de Cálcio Arterial Coronário (CAC), Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

ABSTRACT

Context: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) significantly impacts the progression of coronary atherosclerosis, with high heterogeneity. Insulin resistance is etiologically related to multiple risk factors that potentiate atherogenesis to varying degrees.

Objective: To better understand the factors associated with coronary artery calcium (CAC) incidence/progression, we studied 4,331 individuals from the ELSA-Brasil cohort.

Methods: Individuals with T2DM presented higher rates of CAC incidence/progression compared to participants without diabetes. Among 461 individuals with T2DM, non-statin users and without atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) at baseline, 143 (31.0%) presented CAC incidence/progression, and the concentration of small high-density lipoprotein (HDL) particles showed a significant association with these outcomes.

Results: Higher plasma concentration (3rd tertile) of HDL particles <8 nm (HDLp1) was associated with a higher likelihood of CAC incidence/progression (odds ratio [OR] = 2.40; 95% CI: 1.32–3.40; $p < 0.001$) compared to the 1st tertile, corresponding to an approximate 140% increase. The inclusion of HDLp1 was also associated with a net reclassification improvement of 13.6% (NRI = 0.136; 95% CI: 0.028–0.188; $p = 0.004$), indicating better classification of CAC incidence/progression risk.

Conclusion: HDLp1 concentration demonstrates a significant association with CAC incidence/progression in individuals with T2DM.

Keywords: HDL, Atherosclerosis, Type 2 Diabetes Mellitus, Coronary Artery Calcium (CAC), Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Lista de abreviaturas e siglas

ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
AIC	Critério de Informação de Akaike
ASCVD	Doença cardiovascular aterosclerótica (<i>Atherosclerotic Cardiovascular Disease</i>)
AUC-ROC / AUROC	Área sob a curva <i>Receiver Operating Characteristic</i>
CAC / CACS	Escore de Cálcio Arterial Coronário
CEPs	Comitês de Ética em Pesquisa
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DP	Desvio padrão
ECG	Eletrcardiograma
ELSA-Brasil	Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDLp1	Subfração pequena de HDL (< 8 nm)
HDLp2–HDLp7	Subclasses de partículas de HDL
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IMC	Índice de massa corporal
IQR	Intervalo interquartil
LCAT	Lecitina-colesterol <i>aciltransferase</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Colesterol de lipoproteína de baixa densidade

LDL-P	Número de partículas de LDL
Lp(a)	Lipoproteína(a)
MESA	Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis
NRI	Índice de Reclassificação Líquida
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR-as	Proteína C-reativa de alta sensibilidade
RMN	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
TC	Tomografia computadorizada
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRC	Transporte reverso de colesterol
TRL	Lipoproteínas ricas em triglicerídeos
UH (HU)	Unidades Hounsfield
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectros de vários padrões de referência de subclasse de lipoproteína na biblioteca de deconvolução. Os componentes da subclasse foram isolados por ultracentrifugação e cromatografia em coluna de agarose. VL, VLDL grande; VM, VLDL médio; VS, VLDL pequeno; IDL, lipoproteínas de densidade intermediária; LL, LDL grande; LM, LDL médio; LS, LDL pequeno; HL, HDL grande; HM, HDL médio; HS, HDL pequeno (10).	18
Figura 2. Visão geral comparativa dos efeitos do controle glicêmico normal e prejudicado na funcionalidade da partícula HDLp1 e no transporte reverso de colesterol.	24
Figura 3. Estágios da progressão da placa aterosclerótica coronariana e sua correlação com as imagens de tomografia computadorizada (Escore de Cálcio Coronariano - CAC).	28
Figura 4. Fluxograma do estudo.	46
Figura 5. Curva ROC para predição de CAC incidente após 5, 1 anos de seguimento, comparando modelos de regressão logística multivariável com e sem a inclusão de partículas de HDL de 7–8 nm (HDLp1).	49
Figura 6. <i>Spline</i> cúbica restrita da probabilidade de incidência de CAC ao longo de 5, 1 anos de seguimento, segundo os níveis plasmáticos basais de HDLp1 (7–8 nm). 50	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Intervalos de diâmetro de subclasses de lipoproteínas mensuradas por espectroscopia de RMN	20
Tabela 2. Características basais da população do estudo ($N = 4.331$).....	43
Tabela 3. Participantes diabéticos sem ASCVD clínica e sem uso de estatina	45
Tabela 4. Regressão logística multivariável para prever a incidência de CAC após 5, 1 anos (DP 0, 9) de acompanhamento.....	48
Tabela 5. Comparação da capacidade discriminatória dos modelos para predição de incidência de CAC.	49
Tabela 6. Comparação multivariada entre subgrupos de tercís de HDLp1 para o risco de CACS incidente após um acompanhamento de 5, 1 $\pm$ 0, 9 anos.....	51
Tabela 7. Melhoria líquida de reclassificação (NRI) para incidência ou progressão de CAC, considerando o limite de baixo risco em 5% e o limite de alto risco em 20%..	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Formação e função das partículas de HDL no metabolismo lipídico	13
1.2 Métodos de Medição das Partículas de HDL e Suas Implicações	15
1.3 Ultracentrifugação em gradiente de densidade	15
1.4 Eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE)	16
1.5 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)	17
1.6 Comparação dos métodos de medição	21
1.7 Impacto do Controle Glicêmico Inadequado no Funcionamento das Partículas de HDL e Progressão da Aterosclerose.....	22
1.8 Glicação não enzimática e alterações na Apolipoproteína A-I (ApoA-I) 23	23
1.9 Oxidação das partículas de HDL	23
1.10 Alterações nas funções antioxidantes e anti-inflamatórias do HDL....	24
1.11 Papel do controle glicêmico na modulação da progressão da aterosclerose	25
2 O PAPEL DO SCORE DE CÁLCIO ARTERIAL CORONÁRIO (CAC) NA IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES DE ALTO RISCO	26
2.1 O conceito do escore de cálcio arterial coronariano (CAC)	26
2.2 Progressão do CAC e sua relação com o risco cardiovascular.....	29
2.3 O papel do CAC na identificação precoce de pacientes de alto risco... 30	30
2.4 CAC e a estratificação do risco em indivíduos com DM2.....	31

3 JUSTIFICATIVA.....	32
4 OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo geral	34
4.2 Objetivos específicos	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 População do Estudo	35
5.2 Critérios de Inclusão e Exclusão.....	36
5.3 Coleta de Dados	37
5.4 Medição das partículas de HDL	37
5.5 Medição do Escore de Cálcio Arterial Coronariano (CAC).	38
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
7 RESULTADOS.....	42
8 DISCUSSÃO	53
9 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63
10 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO	73
ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Formação e função das partículas de HDL no metabolismo lipídico

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) constituem elementos essenciais do metabolismo lipídico e exercem função protetora no sistema cardiovascular, atuando primordialmente na mediação do transporte reverso de colesterol (TRC). O TRC viabiliza a remoção do colesterol de células periféricas, com ênfase nos macrófagos da parede arterial, para o seu transporte ao fígado e subsequente excreção biliar. Este mecanismo é determinante na prevenção do acúmulo lipídico tecidual, mitigando a formação de placas ateroscleróticas, que representam o principal substrato da aterosclerose coronariana (1).

A formação das partículas de HDL decorre da interação da apolipoproteína A-I (ApoA-I), sua principal proteína estrutural, com fosfolipídios e colesterol livre de origem periférica. Nesse estágio inicial, a HDL apresenta configuração discoide e baixo conteúdo lipídico. O transportador *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), expresso nas células periféricas, medeia a transferência de colesterol e fosfolipídios para a ApoA-I, dando origem às partículas nascentes. À medida que ocorre a incorporação progressiva de colesterol, essas estruturas sofrem remodelação para formas esféricas, em um processo dependente da atividade da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) (2).

A enzima LCAT é indispensável para a maturação da HDL. Sua função consiste na esterificação do colesterol livre na superfície da lipoproteína, convertendo-o em éster de colesterol, que migra para o núcleo (core) da partícula em função de sua natureza hidrofóbica. Esta transição amplia a capacidade da HDL em captar colesterol

adicional das células periféricas e consolida o início do transporte centrípeto ao fígado. Adicionalmente, a HDL participa da remoção de colesterol das células espumosas, as quais consistem em macrófagos sobrecarregados de lipídios acumulados em lesões ateroscleróticas. No decorrer de seu processo de maturação, as partículas de HDL sofrem modificações estruturais significativas que determinam sua heterogeneidade funcional. Durante este fenômeno, a HDL interage com um complexo sistema de enzimas e proteínas reguladoras que modulam suas propriedades físico-químicas e determinam a sua capacidade em mediar o TRC. Uma dessas proteínas fundamentais, complementar à ação da LCAT, é a proteína de transferência de éster de colesterol (*cholesteryl ester transfer protein* – CETP), que catalisa a troca de ésteres de colesterol da HDL por triglicerídeos provenientes de lipoproteínas de baixa densidade (*low-density lipoprotein* – LDL) e de muito baixa densidade (*very low-density lipoprotein* – VLDL). Este mecanismo é vital para o remodelamento e a homeostase funcional das partículas de HDL, viabilizando o fluxo centrípeto de colesterol ao fígado para posterior excreção (2, 4).

A maturação e a eficiência funcional das partículas de HDL são diretamente moduladas por suas dimensões moleculares e composição proteica. As subfrações de HDL são categorizadas em três classes principais de acordo com o diâmetro: HDL2, HDL3 e a subfração emergente HDLp1, intimamente vinculada ao incremento do risco cardiovascular. O HDL2, constituído por partículas de maior volume (diâmetros > 9 nm), demonstra superioridade funcional no TRC, apresentando elevada capacidade de promover o efluxo de colesterol de macrófagos e inibir a modificação oxidativa das LDL. Em contrapartida, o HDL3, caracterizado por partículas menores (entre 8 e 9 nm), exibe competência reduzida na mediação do

TRC, embora preserve propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias clinicamente relevantes (1, 5).

Nesse cenário, as subfrações compostas por partículas de dimensões mínimas (< 8 nm), tem despertado crescente interesse científico devido ao seu papel fisiopatológico na aterosclerose coronariana. Investigações prévias sugerem que subfrações de menor diâmetro, notadamente a HDLp1 e a HDL3c, apresentem eficácia reduzida tanto na remoção de colesterol dos tecidos periféricos quanto na regulação do estresse oxidativo. Em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cenário no qual a glicação não enzimática da *apolipoproteína A-I* poderia comprometer sensivelmente a atividade biológica da lipoproteína, cogita-se que a presença dessas partículas disfuncionais esteja vinculada a uma progressão acelerada da aterosclerose (4, 6, 7, 8).

1.2 Métodos de Medição das Partículas de HDL e Suas Implicações

A caracterização fenotípica das partículas de HDL tem se modificado ao longo das últimas décadas, acompanhando o aprimoramento de métodos capazes de discriminar suas subfrações com maior precisão. As diferentes abordagens analíticas oferecem informações sobre a organização molecular das partículas, suas propriedades funcionais e sua relação com a estratificação do risco cardiovascular. A integração desses dados contribui para a melhor compreensão da associação entre o metabolismo da HDL e os mecanismos envolvidos na gênese da aterosclerose.

1.3 Ultracentrifugação em gradiente de densidade

A ultracentrifugação em gradiente de densidade configura-se como um dos métodos pioneiros e extensivamente empregados na compartimentação das subfrações de HDL de acordo com suas propriedades densitométricas. Por meio deste método, as partículas são segregadas em HDL2 (partículas de maior diâmetro e menor densidade) e HDL3 (partículas menores e mais densas), propiciando uma avaliação preliminar da heterogeneidade das subfrações. Todavia, esta metodologia impõe limitações técnicas críticas, incluindo o tempo operacional prolongado e o risco de artefatos por alteração da integridade estrutural das partículas decorrentes das elevadas forças centrífugas aplicadas (8, 9, 10).

A ultracentrifugação permanece útil em contextos de pesquisa básica, porém sua aplicação em estudos populacionais de larga escala é limitada pela complexidade operacional e pela necessidade de infraestrutura especializada. Além disso, a técnica não é capaz de fornecer a caracterização detalhada de subfrações de menor diâmetro, como o HDLp1, cuja detecção é central para este estudo.

1.4 Eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE)

Outro método utilizado para a caracterização das partículas de HDL é a eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE), que separa as partículas de HDL com base em seu tamanho e carga elétrica líquida. Esse método é particularmente eficaz na identificação de subfrações menores de HDL, como o pré- β 1-HDL, que desempenha um papel essencial no início do TRC. No entanto, assim como a ultracentrifugação, o 2D-PAGE é tecnicamente complexo e requer equipamentos avançados, limitando sua aplicabilidade em estudos populacionais de grande escala. Essa limitação das abordagens convencionais sustenta a incorporação de novos

métodos, que permitam identificar alterações em partículas menores, potencialmente presentes antes do desenvolvimento de calcificação coronariana (10, 11).

1.5 Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*, RMN) permite a caracterização do perfil lipoproteico com discriminação das subclasses de LDL, HDL e VLDL, ampliando a análise para além da concentração lipídica isolada. O método baseia-se na detecção dos sinais eletromagnéticos emitidos pelos prótons dos lipídeos, cuja interpretação espectroscópica possibilita diferenciar as partículas conforme seu diâmetro e composição química.

Em contraste com abordagens como a ultracentrifugação e a eletroforese, não há necessidade de separação física das lipoproteínas, o que favorece uma análise direta e reduz interferências relacionadas ao processamento. A partir dessa abordagem, torna-se possível capturar a heterogeneidade das subfrações de HDL não evidenciada por métodos convencionais, aspecto particularmente relevante para a identificação de marcadores associados ao risco aterosclerótico (5, 10).

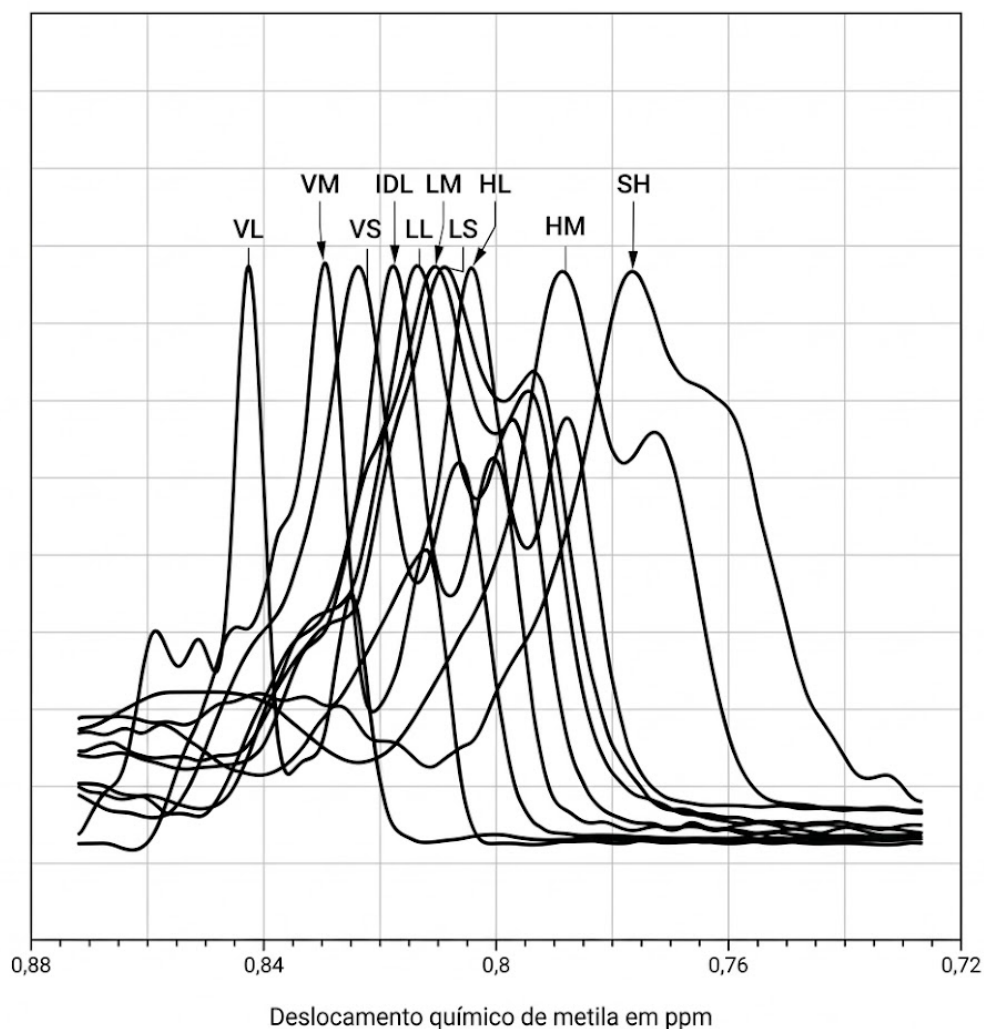


Figura 1. Espectros de vários padrões de referência de subclasse de lipoproteína na biblioteca de deconvolução. Os componentes da subclasse foram isolados por ultracentrifugação e cromatografia em coluna de agarose. VL, VLDL grande; VM, VLDL médio; VS, VLDL pequeno; IDL, lipoproteínas de densidade intermediária; LL, LDL grande; LM, LDL médio; LS, LDL pequeno; HL, HDL grande; HM, HDL médio; HS, HDL pequeno (10).

Um dos atributos centrais deste método reside na capacidade de quantificar o número absoluto de partículas lipoproteicas, parâmetro que frequentemente dissocia-se das concentrações de colesterol. Relatos prévios indicam que indivíduos com

níveis equivalentes de LDL-C podem apresentar contagens distintas de partículas de LDL, fenômeno que impacta o risco cardiovascular de forma substancial. Adicionalmente, a RMN viabiliza a avaliação pormenorizada de subclasses lipoproteicas, incluindo as partículas pequenas e densas de LDL, que demonstram uma associação com o incremento do risco aterosclerótico em virtude de sua maior permeabilidade à parede arterial, elevada suscetibilidade à modificação oxidativa e participação ativa na gênese de células espumosas (5, 12, 13).

A RMN é igualmente determinante na compreensão das alterações estruturais e funcionais das lipoproteínas em cenários metabólicos específicos, notadamente no diabetes mellitus tipo 2. Sob esta condição, ocorrem modificações na composição lipídica e no perfil funcional das partículas, caracterizadas pelo incremento na proporção de partículas pequenas e densas de LDL concomitante à redução da competência biológica das partículas de HDL. Tais variações fenotípicas não são discriminadas com precisão por métodos laboratoriais convencionais, ao passo que a RMN provê uma caracterização abrangente destas alterações, constituindo ferramenta auxiliar na estratificação de risco cardiovascular (5, 12, 13, 14).

Tabela 1. Intervalos de diâmetro de subclasses de lipoproteínas mensuradas por espectroscopia de RMN

Parâmetro de Lipoproteína NMR	Faixa de Diâmetro (nm)
HDL	
HDL pequeno	7,3–8,2
HDL médio	8,2–8,8
HDL grande	8,8–13
LDL	
LDL muito pequeno	18–19,8
LDL médio pequeno	19,8–21,2
IDL	23–27
LDL pequeno	18–21,2
LDL grande	21,2–23
VLDL	
VLDL pequeno	27–35
VLDL médio	35–60
Grande VLDL/quilomícrons	> 60

Outro aspecto relevante reside na aplicação da RMN em investigações que estabelecem a associação entre perfis lipoproteicos e desfechos clínicos. Estudos prévios demonstraram que o número de partículas de LDL (LDL-P) configura-se como um preditor mais fidedigno do risco cardiovascular do que a mensuração isolada do LDL-C, apresentando, inclusive, superioridade à *apolipoproteína B* na estratificação de risco (14).

Subclasses de partículas, como pequenas partículas de LDL e HDL, são associadas a maior risco de progressão da aterosclerose e a eventos cardiovasculares em estudos epidemiológicos e de intervenção clínica. A RMN tem sido usada para monitorar respostas a tratamentos, como terapias que modulam o tamanho e número de partículas de LDL e HDL. Adicionalmente, esta metodologia

permite o cálculo do diâmetro médio das partículas lipoproteicas, provendo dados suplementares acerca do estado metabólico do indivíduo (5, 12, 14).

Por exemplo, tamanhos reduzidos de partículas de LDL estão frequentemente associados a resistência à insulina, síndrome metabólica e diabetes tipo 2. Essa informação, aliada à análise quantitativa de subclasses, contribui para uma avaliação mais precisa do perfil lipídico e metabólico (12, 14).

No contexto da pesquisa clínica, a RMN tem sido progressivamente incorporada à avaliação de alterações lipídicas associadas à aterosclerose, com implicações para a definição de estratégias terapêuticas individualizadas. O conjunto de evidências disponíveis sugere que sua utilização pode contribuir para a compreensão de mecanismos fisiopatológicos ainda pouco caracterizados, além de oferecer subsídios para o refinamento das abordagens de prevenção e tratamento.

1.6 Comparação dos métodos de medição

Em comparação à ultracentrifugação e ao 2D-PAGE, a RMN apresenta atributos técnicos que favorecem sua aplicação em maior escala. Enquanto os métodos convencionais provêm dados sobre a densidade e o diâmetro das partículas de HDL, tais abordagens possuem limitações em eficiência e aplicabilidade clínica. Em contrapartida, a NMR viabiliza uma caracterização pormenorizada e célere das subfrações de HDL, permitindo a identificação de biomarcadores emergentes, como o HDLp1, que parece estar associado diretamente com a progressão da aterosclerose (4, 5, 10).

Investigações como a de Carvalho et al. (2021) reiteram a utilidade da NMR ao evidenciar o vínculo entre variações no diâmetro e na concentração das partículas

lipoproteicas com o risco de progressão de doenças metabólicas. Na referida análise, a RMN permitiu identificar o diâmetro das partículas de lipoproteínas remanescentes de triglicerídeos (*triglyceride-rich lipoproteins* – TRL) como um preditor para o desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2, especificamente em indivíduos que apresentavam HbA1c < 39 mmol/mol (5,7%) na linha de base. Tais evidências sustentam que o diâmetro das partículas de TRL configura-se como um fator de risco precocemente alterado no curso dos processos fisiopatológicos da doença, manifestando-se antes mesmo da consolidação de anormalidades glicêmicas. Esses achados fundamentam o papel da RMN na detecção precoce de alterações lipídicas com relevância clínica e prognóstica (15).

1.7 Impacto do Controle Glicêmico Inadequado no Funcionamento das Partículas de HDL e Progressão da Aterosclerose

O controle glicêmico insatisfatório, observado com frequência em indivíduos acometidos por *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), exerce influência determinante na degradação funcional das partículas de HDL e no avanço da aterosclerose. A hiperglicemia persistente induz modificações estruturais nas lipoproteínas, notadamente via processos de glicação e oxidação, que comprometem suas propriedades cardioprotetoras, como o transporte reverso de colesterol (TRC) e as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Esse cenário é agravado pelo estado inflamatório sistêmico inerente ao DM2, o qual intensifica o nexo entre o desequilíbrio metabólico e a disfunção lipoproteica (6).

1.8 Glicação não enzimática e alterações na Apolipoproteína A-I (ApoA-I)

A glicação não enzimática constitui um dos mecanismos centrais pelos quais a instabilidade glicêmica altera a arquitetura e a competência biológica das partículas de HDL. Sob condições de hiperglicemia, a *apolipoproteína A-I* (ApoA-I), principal componente proteico do HDL, é submetida a modificações pós-traducionais decorrentes da incorporação de grupos glicídicos aos seus resíduos de lisina. Tal fenômeno modifica a conformação da ApoA-I, o que prejudica sua interação adequada com receptores responsáveis pela promoção do efluxo de colesterol, como o *scavenger receptor class B type I* (SR-BI) e o *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), ambos imprescindíveis para a execução do TRC (3, 6).

Essas alterações estruturais resultam em uma redução na eficiência do TRC, uma das principais funções protetoras do HDL. A capacidade de promover o efluxo de colesterol dos macrófagos e das células espumosas é crucial para evitar o acúmulo de colesterol nas paredes arteriais, que leva à formação de placas ateroscleróticas. Quando ocorre a glicação da ApoA-I, a funcionalidade desse mecanismo é comprometida, o que facilita a retenção lipídica e impulsiona a aterogênese (Figura 2). Esse processo é especialmente importante em pacientes com DM2, nos quais a oscilação glicêmica crônica apresenta um vínculo direto com o aumento do risco de eventos cardiovasculares (1).

1.9 Oxidação das partículas de HDL

Outro mecanismo central pelo qual a instabilidade glicêmica afeta o HDL é o estresse oxidativo. A hiperglicemia persistente eleva a produção de espécies reativas

de oxigênio (EROs), fomentando a oxidação das partículas de HDL, com destaque para as subfrações de menor diâmetro, como o HDLp1 e o HDL3c. A modificação oxidativa das partículas de HDL prejudica sua competência biológica, afetando especialmente sua propriedade antioxidante (Figura 2). Em condições fisiológicas, o HDL atua na inibição da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), dificultando o acúmulo de LDL oxidadas na íntima arterial; todavia, ao sofrer oxidação, o HDL perde esse potencial protetor (6, 16, 17).

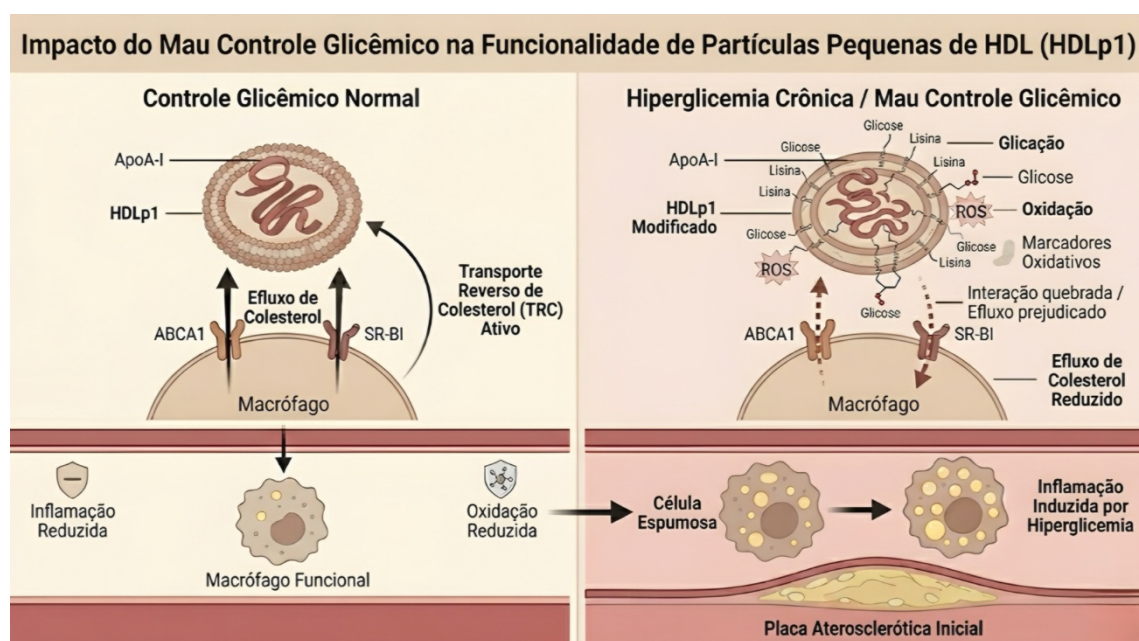


Figura 2. Visão geral comparativa dos efeitos do controle glicêmico normal e prejudicado na funcionalidade da partícula HDLp1 e no transporte reverso de colesterol.

1.10 Alterações nas funções antioxidantes e anti-inflamatórias do HDL

Para além de sua participação no transporte reverso de colesterol, o HDL exerce funções relacionadas à modulação do estresse oxidativo e da resposta inflamatória. Em condições fisiológicas, contribui para a neutralização de espécies

reativas de oxigênio e para a atenuação da ativação de células inflamatórias, incluindo macrófagos. Esse perfil funcional se altera no contexto de hiperglicemia crônica. Processos de oxidação e glicação das partículas, particularmente nas subfrações de menor diâmetro, como HDLp1 e HDL3c, comprometem sua capacidade de exercer esses efeitos. Como consequência, observa-se intensificação do estado inflamatório na parede arterial, favorecendo o acúmulo de macrófagos e a formação de células espumosas. A presença dessas células está associada à constituição de placas ateroscleróticas com maior instabilidade, condição que se relaciona a maior probabilidade de eventos cardiovasculares, como o infarto do miocárdio. Em paralelo, a redução da atividade anti-inflamatória do HDL contribui para a manutenção de um ambiente pró-aterogênico, no qual citocinas como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha* - TNF- α) contribuem para a progressão da doença (1, 6, 18).

1.11 Papel do controle glicêmico na modulação da progressão da aterosclerose

Indivíduos com DM2 que mantêm níveis glicêmicos estáveis apresentam menor propensão a disfunções nas partículas de HDL. Evidências sugerem que a redução dos níveis de HbA1c guarda relação com a melhora na funcionalidade lipoproteica, tanto na mediação do TRC quanto em suas propriedades antioxidantes. Tal observação reforça a necessidade do manejo glicêmico rigoroso para mitigar danos estruturais ao HDL e reduzir o risco de evolução da aterosclerose. Embora o controle da HbA1c seja fundamental, o monitoramento de biomarcadores funcionais como o HDLp1 assume relevância singular, pois estes podem sinalizar o início da aterogênese

antes mesmo que o controle glicêmico isolado seja capaz de prever a progressão da calcificação arterial (6).

2 O PAPEL DO ESCORE DE CÁLCIO ARTERIAL CORONÁRIO (CAC) NA IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES DE ALTO RISCO

2.1 O conceito do escore de cálcio arterial coronariano (CAC)

O escore de cálcio arterial coronariano (CAC) é uma medida quantitativa que avalia a presença e a extensão da calcificação nas artérias coronárias, sendo amplamente reconhecido como um marcador de aterosclerose, particularmente em sua forma subclínica. A calcificação coronariana é quase exclusivamente encontrada em contextos de doença aterosclerótica e serve como indicador indireto da carga total de placas ateroscleróticas presentes na parede arterial, refletindo o acúmulo progressivo de alterações estruturais ao longo do desenvolvimento da doença (19).

O CAC é determinado por meio de tomografia computadorizada (TC) não contrastada, técnica que permite a visualização direta do acúmulo de cálcio nas artérias coronárias. A presença de cálcio nas placas ateroscleróticas reflete o estágio mais avançado da doença, no qual as placas já se encontram em um processo de estabilização, indicando o risco acumulado ao longo do tempo (19).

A pontuação do CAC é calculada utilizando o método de Agatston, o qual quantifica a carga de cálcio presente nas artérias coronárias por meio da atribuição de um valor numérico baseado na extensão e na densidade das áreas calcificadas. Para sua execução, as imagens são adquiridas por TC utilizando cortes axiais de alta resolução que cobrem toda a extensão do coração, permitindo uma avaliação abrangente do leito coronariano (19).

A sincronização com o eletrocardiograma (ECG) é essencial para minimizar artefatos causados pelo movimento cardíaco, contribuindo para maior precisão na mensuração da carga cálcica e maior confiabilidade na determinação do escore (19, 20).

A calcificação coronariana é identificada como uma lesão hiperatenuante com densidade igual ou superior a 130 unidades Hounsfield (UH) e área mínima de 1 mm², o que equivale a aproximadamente três pixels adjacentes nas imagens tomográficas. A partir dessa definição operacional, o método de Agatston estabelece um sistema padronizado de quantificação da carga de cálcio coronariano, fundamentado na detecção e caracterização de focos calcificados ao longo da árvore arterial coronária (19, 20).

Cada lesão calcificada recebe uma pontuação baseada em sua densidade máxima, seguindo a classificação em quatro categorias: 130 a 199 UH (fator de ponderação 1), 200 a 299 UH (fator 2), 300 a 399 UH (fator 3) e 400 UH ou mais (fator 4). Esse sistema de ponderação reflete o aumento progressivo da atenuação radiológica, que está relacionado à maior densidade do conteúdo cálcico e, potencialmente, à complexidade estrutural da placa aterosclerótica (19, 20).

O escore de cada lesão é calculado multiplicando o fator de ponderação pela área da lesão (em mm²), integrando, dessa forma, dois componentes fundamentais: a extensão espacial do depósito calcificado e sua densidade radiológica. Essa abordagem permite a quantificação da contribuição individual de cada foco calcificado para o escore total de cálcio coronariano, o qual corresponde à soma dos escores de todas as lesões identificadas, sendo amplamente utilizado como uma estimativa indireta da carga aterosclerótica coronariana calcificada (19).

Os valores do escore de cálcio arterial coronariano (CAC) são dispostos em diferentes categorias que refletem o risco cardiovascular. Um escore de CAC igual a zero indica ausência de calcificação detectável e está associado a baixo risco de eventos cardiovasculares (Figura 3).

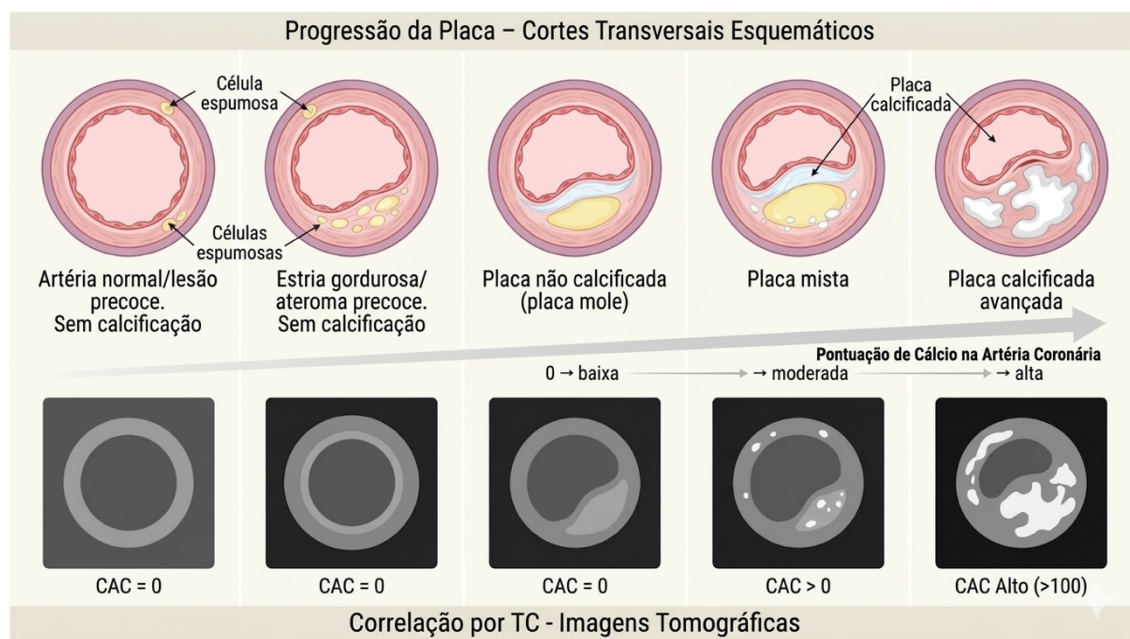


Figura 3. Estágios da progressão da placa aterosclerótica coronariana e sua correlação com as imagens de tomografia computadorizada (Escore de Cálcio Coronariano - CAC).

Valores de CAC entre 1 e 99 correspondem a risco baixo a moderado, ao passo que escores entre 100 e 399 se associam a risco moderado a alto. Níveis iguais ou superiores a 400 indicam maior probabilidade de eventos cardiovasculares e costumam embasar decisões clínicas, incluindo a introdução de estratégias preventivas, por exemplo, o uso de estatinas (Greenland et al., 2018).

Valores de CAC equivalentes a zero indicam ausência de calcificação detectável, ao passo que escores elevados (> 100) guardam relação com um risco

substancialmente superior de eventos cardiovasculares. Por exemplo, um escore CAC ≥ 100 vincula-se a um risco 7,5 vezes maior de eventos ateroscleróticos em um horizonte de 10 anos, quando comparado a indivíduos sem calcificação. Todavia, o CAC não deve ser interpretado de forma estática, visto que sua progressão temporal também constitui um indicador relevante de risco (20, 21).

2.2 Progressão do CAC e sua relação com o risco cardiovascular

O escore de cálcio arterial coronariano (CAC) é amplamente reconhecido como um preditor consistente de eventos cardiovasculares e, nas últimas duas décadas, consolidou-se como ferramenta essencial para a avaliação da aterosclerose subclínica. O CAC não apenas quantifica a carga de calcificação coronariana, mas também propicia uma estimativa acurada do risco de eventos em indivíduos com ou sem manifestações clínicas evidentes.

Diversas investigações de relevância, a exemplo do *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis* (MESA), demonstraram que o CAC figura entre os preditores mais consistentes de eventos cardiovasculares em distintos grupos étnicos e faixas etárias. Adicionalmente, o diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 apresenta um vínculo com a progressão acelerada do CAC, fenômeno que eleva o risco de desfechos coronarianos nesta população (21, 22, 23).

Além do valor absoluto do escore, a progressão do CAC ao longo do tempo possui implicações prognósticas relevantes. Evidências indicam que indivíduos que apresentam incremento na calcificação em avaliações seriadas encontram-se sob maior risco de eventos cardiovasculares. Esta vulnerabilidade é especialmente pertinente em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), uma vez que a doença

guarda relação com a progressão acelerada da calcificação arterial. Por exemplo, em indivíduos com DM2, a evolução do CAC foi observada em até 22% dos casos em um intervalo de cinco anos, frente a aproximadamente 11% em indivíduos sem a enfermidade (24).

Tais dados sugerem que, na população diabética, a aterosclerose não apenas exibe maior prevalência, mas também apresenta um curso clínico mais célere e agressivo, elevando substancialmente o risco de desfechos como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (24).

2.3 O papel do CAC na identificação precoce de pacientes de alto risco

O principal valor clínico do escore CAC está na sua capacidade de identificar precocemente indivíduos sob risco de eventos cardiovasculares, frequentemente antes que os sintomas apareçam. A ausência de calcificação (CAC = 0) apresenta uma relação com um risco muito baixo de eventos a curto prazo, conceito conhecido como "período de garantia". Durante esse intervalo, que pode durar de 5 a 10 anos, a chance de eventos ateroscleróticos é mínima, o que pode permitir o adiamento de tratamentos farmacológicos intensivos em casos selecionados (22, 24).

No entanto, mesmo indivíduos que inicialmente apresentam CAC = 0 podem evoluir para calcificação ao longo do tempo, especialmente se estiverem expostos a fatores de risco, como o DM2. O estudo MESA demonstrou que indivíduos com DM2 têm uma probabilidade significativamente maior de desenvolver calcificação coronariana ao longo do tempo, mesmo que inicialmente apresentem CAC = 0. Esses achados sugerem que o monitoramento regular do CAC, particularmente em populações de alto risco, como os diabéticos, pode ser crucial para detectar a

progressão subclínica da aterosclerose e intervir precocemente para reduzir o risco de eventos fatais (20, 22, 24).

2.4 CAC e a estratificação do risco em indivíduos com DM2

Indivíduos com DM2 representam um grupo de interesse central na avaliação do CAC, devido ao impacto direto da doença na aceleração da calcificação arterial. O diabetes induz um ambiente pró-inflamatório e pró-aterogênico, marcado pela hiperglicemia, dislipidemia, resistência à insulina e estresse oxidativo. Tais fatores potencializam a deposição de cálcio nas placas ateroscleróticas, o que resulta em uma progressão acelerada dos escores de cálcio (25).

Investigações como o estudo PREVEND demonstram que pacientes com diabetes exibem graus mais elevados de calcificação coronariana, fator que guarda relação direta com o incremento do risco cardiovascular. Paralelamente, o *Dallas Heart Study* revelou que biomarcadores emergentes, como as subfrações de HDL, apresentam associação com a progressão do CAC em indivíduos com DM2. Esses dados sugerem que a análise conjunta de biomarcadores lipídicos e do CAC pode elevar a precisão da estratificação de risco nessa população (2, 25).

3 JUSTIFICATIVA

A aterosclerose em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) exibe um curso clínico acelerado, o que demanda ferramentas de monitoramento cada vez mais sensíveis. Embora o escore de cálcio arterial coronariano (CAC) seja o padrão-ouro para quantificar a carga aterosclerótica estrutural, conforme demonstrado em grandes coortes como o MESA e o ELSA-Brasil, ele reflete estágios em que a calcificação já é detectável por imagem. Surge, portanto, a necessidade de identificar biomarcadores funcionais que guardem relação não apenas com a presença do cálcio, mas com a dinâmica de sua evolução (21, 23, 26).

As subfrações de HDL, com ênfase no HDLp1, apresentam propriedades biológicas que podem ser alteradas precocemente pelo ambiente metabólico do diabetes. Compreender como esses níveis plasmáticos se vinculam à progressão do CAC, tanto na conversão de escores nulos para positivos quanto no incremento da carga calcificada pré-existente, é essencial para elucidar o papel dessas partículas na história natural da doença coronariana (4, 6).

Sob essa perspectiva, propõe-se um modelo conceitual no qual a HDLp1 possa ocupar uma posição inicial na cascata fisiopatológica da aterosclerose, atuando como um potencial marcador de disfunção lipoproteica (função), cuja repercussão poderia se refletir na progressão da carga aterosclerótica mensurada pelo escore de cálcio arterial coronariano (CAC, estrutura), culminando, eventualmente, na expressão clínica da doença cardiovascular. Nesse encadeamento, levanta-se a hipótese de que a disfunção das partículas de HDL preceda, e possivelmente influencie, a velocidade de progressão das alterações estruturais detectáveis, permitindo a identificação precoce de indivíduos com maior propensão a evoluir para desfechos clínicos adversos.

Embora o CAC seja amplamente reconhecido como um marcador robusto de aterosclerose subclínica, sua detecção está condicionada à presença de alterações estruturais já estabelecidas na parede arterial. Nesse contexto, a investigação de marcadores que reflitam alterações biológicas em fases ainda mais precoces, possivelmente anteriores à própria calcificação detectável, emerge como um foco relevante de investigação. Assim, postula-se que alterações na funcionalidade das partículas de HDL, particularmente da subfração HDLp1, possam anteceder a expressão fenotípica da doença mensurada pelo CAC. Nesse contexto, levanta-se a hipótese de que a HDLp1 possa atuar como um biomarcador de vulnerabilidade vascular incipiente, sendo potencialmente capaz de refletir alterações funcionais que precedem a detecção morfológica da aterosclerose e sua consequente manifestação clínica ou, ainda, de sinalizar trajetórias evolutivas mais agressivas em indivíduos com lesões já estabelecidas (4, 6, 8).

Tal hipótese está alinhada à lógica de investigação de marcadores metabólicos em estágios pré-clínicos da doença cardiovascular, conforme demonstrado por Carvalho et al. (15), que evidenciaram a utilidade de subfrações lipoproteicas na identificação de risco subclínico. Dessa forma, ao integrar marcadores funcionais e estruturais em um mesmo eixo analítico, este estudo busca explorar uma lacuna relevante na literatura, investigando se a HDLp1 pode contribuir para a estratificação precoce do risco de progressão da aterosclerose, especialmente em populações de maior vulnerabilidade, como indivíduos com DM2, a partir de dados longitudinais do ELSA-Brasil (4, 6).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre os níveis plasmáticos de partículas pequenas de HDL (HDLp1) e a progressão da aterosclerose coronariana, medida pelo escore de cálcio arterial coronariano (CAC), em indivíduos com diabetes tipo 2 (DM2) do estudo ELSA-Brasil.

4.2 Objetivos específicos

- a. Analisar se a inclusão do HDLp1 como biomarcador adicional melhora a capacidade de discriminação do modelo de predição de progressão do CAC em comparação aos fatores de risco tradicionais.
- b. Examinar a relação entre o controle glicêmico inadequado e as disfunções nas subfrações de HDL, especificamente no HDLp1, e seu impacto na progressão da aterosclerose coronariana.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 População do Estudo

O presente estudo é uma análise secundária do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil), uma coorte multicêntrica composta por 15.105 participantes brasileiros com idades entre 35 e 74 anos, recrutados entre 2008 e 2010. O ELSA-Brasil foi desenvolvido com o objetivo de investigar os determinantes das doenças cardiovasculares e metabólicas, particularmente o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (26, 27).

O estudo ELSA foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa (CEPs) das instituições envolvidas, cumprindo todos os requisitos éticos necessários para pesquisas com seres humanos, registrado sob o CAAE: 0016.198.000-06. Entre esses requisitos, estão: (i) a participação voluntária, (ii) a garantia de privacidade dos participantes e a (iii) confidencialidade das informações. As estratégias adotadas minimizam fatores de exclusão, incluindo a adaptação das instalações físicas dos Centros de Investigação para pessoas com necessidades especiais (26, 27).

Os funcionários das seis instituições participantes assinam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, documento que assegura seus direitos e deveres. Para tanto, contam com suporte de um profissional capacitado para esclarecer dúvidas e têm a liberdade de consultar terceiros antes de firmar o consentimento (26, 27).

Nos Centros de Investigação do ELSA, os participantes realizam entrevistas e exames conduzidos por profissionais qualificados, seguindo protocolos estabelecidos pelo Comitê Diretivo e normas nacionais de proteção à saúde. Os resultados de exames com relevância clínica são fornecidos aos participantes, acompanhados de

explicações detalhadas. Caso algum problema de saúde seja identificado durante os procedimentos, o participante é encaminhado a uma unidade de saúde previamente definida (26, 27).

A confidencialidade dos dados obtidos foi rigorosamente preservada em todas as etapas do estudo. As informações são armazenadas de forma anonimizada e usadas exclusivamente para fins científicos, com acesso restrito aos pesquisadores do projeto. Amostras biológicas coletadas ao longo da pesquisa são gerenciadas pelo Comitê Diretivo e coordenadores dos Centros de Investigação, sendo utilizadas apenas de acordo com os procedimentos aprovados pelos CEPs e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (26, 27).

Para esta análise, foram incluídos 4.331 participantes com avaliações de calcificação arterial coronariana (CAC) realizadas no início do estudo. Destes, 3.056 participantes realizaram uma segunda avaliação de CAC após um período médio de $5,1 \pm 0,9$ anos, resultando em uma população final de 461 participantes com DM2.

5.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

- **Critérios de Inclusão:**

- Indivíduos diagnosticados com **diabetes mellitus tipo 2 (DM2)** maiores que 18 anos.
- Participantes com pelo menos uma medição válida de HDL e CAC no período de acompanhamento.

- **Crêterios de Exclusão:**

- Participantes com histórico de eventos cardiovasculares prévios, como infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral.
- Pacientes com insuficiência renal grave (taxa de filtração glomerular estimada [TFGe] < 30 mL/min/1,73 m²).
- Indivíduos com dados incompletos ou inválidos sobre as medições de HDL ou CAC.

5.3 Coleta de Dados

Os dados foram coletados durante as visitas clínicas realizadas periodicamente ao longo do estudo. As informações incluíram dados demográficos, histórico médico detalhado, uso de medicamentos, hábitos de vida (tabagismo, consumo de álcool, atividade física), medidas antropométricas (peso, altura, circunferência abdominal) e dados laboratoriais, como perfil lipídico e glicêmico. Os níveis plasmáticos de HDL foram obtidos de amostras de sangue armazenadas em nitrogênio líquido, coletadas durante as visitas clínicas.

Os participantes realizaram dois exames de tomografia computadorizada (TC) para avaliar a calcificação coronariana, sendo a primeira na linha de base e a segunda após um período médio de $5,1 \pm 0,9$ anos.

5.4 Medição das partículas de HDL

As partículas de HDL foram quantificadas utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), uma metodologia altamente precisa que permite a medição

direta do tamanho e número das subfrações de HDL. A técnica de RMN foi realizada por meio do método NMR *LipoProfile* (LabCorp, USA), que quantifica partículas de HDL grandes, médias e pequenas. As partículas de interesse para este estudo foram as menores subfrações, especificamente o HDLp1, com diâmetro inferior a 8 nm, que estão associadas a um risco elevado de eventos cardiovasculares, particularmente em indivíduos com DM2.

A RMN foi escolhida por sua capacidade de preservar a integridade estrutural e funcional das partículas de HDL, oferecendo uma vantagem significativa sobre métodos tradicionais como ultracentrifugação e eletroforese em gel.

5.5 Medição do Escore de Cálcio Arterial Coronariano (CAC)

As tomografias foram realizadas em um tomógrafo de múltiplos detectores de 64 cortes (*Philips Brilliance; Philips, Amsterdam, Países Baixos*), com técnica padrão para a pontuação de cálcio arterial coronariano (CAC), incluindo aquisição prospectiva em meados da diástole; tensão do tubo de 120 KVp; e corrente variável baseada no índice de massa corporal. O CAC foi quantificado pelo método de Agatston, que é a soma do produto área-densidade. Em resumo, a área individual das lesões com 3 ou mais pixels contíguos acima de um limiar de 130 unidades Hounsfield (HU) é multiplicada por um fator de densidade de 1 para uma atenuação de pico de 130–199 HU; 2 para 200–299 HU; 3 para 300–399 HU; e 4 para ≥ 400 HU. O escore total de CAC é obtido somando os produtos área-densidade das lesões individuais. Este método é confiável e reprodutível, com baixa variabilidade entre exames (26, 28).

- **Definição de Incidência e Progressão do CAC:**

- A **incidência de CAC** foi definida como qualquer aumento do escore de Agatston acima de zero em indivíduos que apresentavam CAC = 0 na linha de base.
- A **progressão do CAC** foi definida como um aumento absoluto de 100 unidades no escore de Agatston entre a linha de base e a segunda avaliação.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características basais foram examinadas usando os testes χ^2 , teste t de *Student* para variáveis independentes e Mann-Whitney (ou Kruskal-Wallis para comparações entre tercís). A normalidade das variáveis contínuas foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, complementado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, além da análise visual de histogramas e gráficos Q-Q.

Regressões logísticas *stepwise* bidirecionais (both) foram usadas para identificar fatores de risco para incidência ou progressão de CAC, utilizando o Critério de Informação de *Akaike* (AIC) como parâmetro para estimar a quantidade relativa de informações perdidas e garantir a parcimônia do modelo.

As covariáveis candidatas foram inicialmente selecionadas com base em relevância clínica e evidência prévia na literatura, sendo posteriormente submetidas ao procedimento *stepwise* bidirecional (*forward* e *backward*), com seleção final baseada no AIC. Variáveis normalmente e não normalmente distribuídas foram descritas, respectivamente, como média $\pm$ desvio padrão [DP] e mediana (intervalo interquartil [IQR]).

Modelos de regressão logística multivariável foram aplicados para avaliar a associação entre os níveis plasmáticos de HDLp1 e a progressão do CAC, ajustando para potenciais fatores de confusão, como idade, sexo, pressão arterial, LDL-C, triglicerídeos, tabagismo, índice de massa corporal (IMC), proteína C-reativa de alta sensibilidade (*PCR-as*), *clearance* de creatinina, HbA1c e escore de CAC basal. A capacidade discriminatória dos modelos foi avaliada pela área sob a curva *Receiver Operating Characteristic* (AUC-ROC), e a comparação entre as áreas (modelo baseline vs. modelo com HDLp1) foi realizada utilizando o teste de DeLong para curvas ROC correlacionadas.

A análise de interação entre o HDLp1 e o controle glicêmico (HbA1c) foi realizada para investigar o impacto do controle glicêmico inadequado sobre a disfunção das partículas de HDL em pacientes diabéticos não usuários de estatinas. Considerando o desenho observacional do estudo e a ausência de uma exposição dicotômica claramente definida, optou-se pelo ajuste multivariável em detrimento de métodos baseados em escore de propensão.

O Índice de Reclassificação Líquida (NRI) categórico foi calculado para avaliar o aumento na capacidade de discriminação e acurácia do modelo ao incluir o HDLp1 como biomarcador adicional, considerando os limites de risco clínico em 5% e 20%.

As análises foram conduzidas no software R Studio (v.3.5.3). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, e intervalos de confiança de 95% foram utilizados para todas as análises.

7 RESULTADOS

A amostra final analisada compreendeu participantes da coorte ELSA-Brasil, estratificados em quatro subgrupos conforme o status glicêmico basal e a presença de calcificação coronária na linha de base: indivíduos sem diabetes ($n=2.665$ com $CACS=0$ e $n=817$ com $CACS\geq 1$) e indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2, $n=473$ com $CACS=0$ e $n=376$ com $CACS\geq 1$).

A análise das características basais (Tabela 2) revelou que os participantes com DM2 apresentavam, de forma consistente, maior idade média ($51,48 \pm 8,01$ vs. $47,91 \pm 7,53$ anos no grupo $CACS=0$; $p < 0,001$) e um fenótipo cardiometabólico mais adverso. Especificamente, indivíduos com DM2 e $CACS=0$ exibiram maior índice de massa corporal ($30,03 \pm 5,65$ vs. $26,65 \pm 4,61$ kg/m²; $p < 0,001$), níveis pressóricos sistólicos mais elevados ($123,39 \pm 16,82$ vs. $115,98 \pm 14,58$ mmHg; $p < 0,001$) e maior mediana de triglicerídeos ($158,63$ vs. $117,62$ mg/dL; $p < 0,001$) em comparação aos seus pares não diabéticos.

Observou-se ainda uma distribuição heterogênea da composição étnica entre os grupos ($p < 0,001$), com maior proporção de indivíduos de etnia asiática entre aqueles com DM2 e presença de calcificação coronária basal. No grupo de indivíduos sem diabetes e com escore de cálcio zero, os asiáticos representavam 3,7% da amostra. Em contrapartida, no grupo de indivíduos diabéticos que já apresentavam carga aterosclerótica basal ($CACS \geq 1$), essa proporção elevou-se para 10,4%. Adicionalmente, indivíduos com DM2 apresentaram níveis sistematicamente mais baixos de lipoproteína(a) [Lp(a)] em comparação aos participantes sem diabetes, tanto no estrato com $CACS=0$ quanto naqueles com $CACS\geq 1$. No estrato com $CACS$ igual a zero, as médias foram de $6,50 \pm 4,94$ mg/dL para o grupo diabético e $7,08 \pm 4,44$ mg/dL para os não diabéticos. Já entre aqueles com calcificação presente ($CACS \geq$

1), a disparidade persistiu, com valores de $6,43 \pm 4,82$ mg/dL no grupo DM2 frente a $7,48 \pm 5,21$ mg/dL no grupo sem diabetes (Tabela 2).

Tabela 2. Características basais da população do estudo ($N = 4.331$)

	CACS = 0 na linha de base		CACS ≥ 1 na linha de base		p
	Sem diabetes	Diabetes	Sem diabetes	Diabetes	
Participantes, n (%)	2665 (%)	473 (%)	817 (%)	376 (%)	
Idade, anos	$47,91 \pm 7,53$	$51,48 \pm 8,01$	$55,92 \pm 8,36$	$58,85 \pm 8,46$	<0,001
Sexo, feminino (%)	1665 (62,5)	$264 \pm 55,8$	$305 \pm 37,3$	$126 \pm 33,5$	<0,001
Raça, autodeclarada (%)					<0,001
Branco	592 (22,4)	$112 \pm 24,0$	$149 \pm 18,6$	$77 \pm 21,0$	
Preto	$373 \pm 14,1$	$93 \pm 19,9$	$82 \pm 10,2$	$43 \pm 11,7$	
Pardo	$1546 \pm 58,6$	$240 \pm 51,4$	$532 \pm 66,4$	$201 \pm 54,8$	
Asiático	$102 \pm 3,9$	$18 \pm 3,9$	$30 \pm 3,7$	$38 \pm 10,4$	
Nativos Brasileiros/Indígenas	$25 \pm 0,9$	$4 \pm 0,9$	$8 \pm 1,0$	$8 \pm 2,2$	
Escolaridade, (anos)	$5,93 \pm 1,63$	$5,35 \pm 1,83$	$6,02 \pm 1,96$	$5,71 \pm 2,16$	<0,001
Renda familiar (salários mínimos)	$5,39 \pm 2,80$	$5,18 \pm 2,78$	$6,33 \pm 3,10$	$6,18 \pm 3,05$	<0,001
História familiar de DAC prematura (%)	365 (13,9)	78 (16,8)	143 (17,7)	68 (18,5)	0,009
Dislipidemia (%)	1367 (51,3)	268 (56,7)	550 (67,3)	261 (69,6)	<0,001
Tabagismo (%)	1139 (42,7)	210 (44,4)	452 (55,3)	215 (57,2)	<0,001
Uso de antihipertensivos (%)	376 (14,1)	191 (40,4)	220 (27,0)	214 (57,1)	<0,001
Pressão arterial sistólica (mmHg)	$115,98 \pm 14,58$	$123,39 \pm 16,82$	$123,28 \pm 16,50$	$129,13 \pm 17,72$	<0,001
Pressão arterial diastólica (mmHg)	$73,62 \pm 10,15$	$78,52 \pm 11,16$	$76,72 \pm 10,82$	$78,84 \pm 10,82$	<0,001
Índice de massa corporal, (kg/m ²)	$26,65 \pm 4,61$	$30,03 \pm 5,65$	$27,08 \pm 4,41$	$29,21 \pm 4,78$	<0,001
Uso de estatinas (%)	291 (11,3)	137 (30,9)	223 (28,4)	167 (46,0)	<0,001
Lp(a) (mg/dL)	$7,08 \pm 4,44$	$6,50 \pm 4,94$	$7,48 \pm 5,21$	$6,43 \pm 4,82$	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	$214,93 \pm 39,62$	$215,33 \pm 44,05$	$228,88 \pm 41,96$	$217,44 \pm 47,94$	<0,001
Colesterol LDL (mg/dL)	$109,79 \pm 30,44$	$107,53 \pm 33,54$	$118,86 \pm 33,69$	$110,29 \pm 36,68$	<0,001
Colesterol HDL (mg/dL)	$55,88 \pm 14,41$	$52,33 \pm 13,03$	$54,56 \pm 14,62$	$50,96 \pm 14,25$	<0,001
Triglicerídeos, (mg/dL)	117,6 [82–152]	158 [100,0–217,4]	141,9 [93,7–190,2]	170,2 [63,9–276,5]	<0,001
Depuração de creatinina (ml/min/1,73m ²)	103,05 [88,5–120,6]	101,81 [85,6–120,5]	97,0 [82,4–111,8]	98,5 [81,3–116,2]	<0,001
Proteína C-reativa (mg/dL)	2,67 [0,5–4,8]	4,34 [1,4–7,2]	2,37 [0,7–4,1]	3,47 [0,9–6,1]	<0,001

HbA1c (%)	5,21 ± 0,55 *	6,55 ± 1,32 *	5,28 ± 0,50 *	6,70 ± ,52 *	<0,001
Duração do diabetes (anos)	-	4,0 (1,0 - 8,0)	-	7 (3,0 -12,0)	<0,001
Partículas HDL					
HDLp1 (mg/dL)	3,33 (1,85) *	3,00 (1,87) *	3,72 (1,99) *	3,33 (2,05) *	<0,001
HDLp2 (mg/dL)	10,97 (2,84) *	12,38 (3,05) *	11,77 (2,74) *	12,82 (3,19) *	<0,001
HDLp3 (mg/dL)	3,77 (2,06) *	3,60 (2,23) *	3,44 (1,98) *	3,26 (2,17) *	<0,001
HDLp4 (mg/dL)	1,79 (1,03)	1,74 (0,99)	1,71 (0,97) *	1,49 (0,90) *	<0,001
HDLp5 (mg/dL)	0,95 (0,83) *	0,81 (0,72) *	0,90 (0,80)	0,83 (0,83)	<0,001
HDLp6 (mg/dL)	0,92 (1,12) *	0,60 (0,83) *	0,75 (0,89)	0,60 (0,82)	<0,001
HDLp7 (mg/dL)	0,28 (0,33) *	0,22 (0,28) *	0,27 (0,35) *	0,21 (0,32) *	<0,001
Incidência ou progressão do CACS após 5 anos, n (%)†	271 (10,2) *	82 (17,3) *	444 (54,3)	211 (56,1)	<0,001
CACS na linha de base	0 (0)	0 (0)	142,99 (282,34) *	240,18 (457,87) *	<0,001
CACS na segunda avaliação	2,79 (17,10) *	6,80 (26,97) *	213,47 (332,14) *	369,13 (636,68) *	<0,001

CACS, Pontuação de cálcio da artéria coronária

DP, desvio padrão

Lp (a), Lipoproteína(a)

Os dados são médias ± DP para variáveis distribuídas normalmente, medianas (IQR) para dados não paramétricos ou n (%)

Os valores de p são para tendência entre os 4 grupos. Análise estatística: χ^2 para dados categóricos; ANOVA ou Kruskal–Wallis para variáveis contínuas. Bonferroni post-hoc ou teste de Dunn foram feitos quando apropriado para comparar grupos dentro (* para valor de p post-hoc <0,05) e entre (para valor de p post-hoc <0,05) CACS = 0 ou CACS ≥ 1 no subgrupo basa

† Incidência ou progressão do CACS: número absoluto (n) e a proporção (%)

Na análise de associação, o diagnóstico de DM2 demonstrou ser um preditor independente para a ocorrência de incidência ou progressão do CACS, com uma razão de chances (*odds ratio* - OR) não ajustada de 2,01 (IC 95% 1,72–2,36; p <0,001) em comparação aos indivíduos não diabéticos.

O uso de estatinas na coorte geral (n=4.331) foi associado a alterações no perfil de subfrações de HDL, caracterizadas por maiores concentrações de HDLp1 e HDLp2 e menores concentrações de partículas maiores (HDLp3–HDLp7). Considerando o potencial viés de indicação, uma vez que indivíduos com maior risco cardiovascular apresentam maior probabilidade de uso dessas medicações, os usuários de estatinas (n=921) foram excluídos das análises subsequentes.

Considerando apenas indivíduos com DM2, não usuários de estatina e sem histórico de doença cardiovascular aterosclerótica clínica (ASCVD) na linha de base (Tabela 3), foram identificados 461 participantes, dos quais 143 (31,0%) apresentaram incidência ou progressão de CAC ao longo do seguimento (Figura 4).

Tabela 3. Participantes diabéticos sem ASCVD clínica e sem uso de estatina

	Tercis de concentração de HDLp1 (partículas de HDL de 7-8 nm)			p para tendência
	1º tercil (≤ 2 mg/dL)	2º tercil ($2 - 3,8$ mg/dL)	3º tercil ($\geq 3,8$ mg/dL)	
Participantes, n (%)	153 (%)	156 (%)	152 (%)	
Idade, anos	52,99 $\pm$ 8,32	53,74 $\pm$ 9,49	53,41 $\pm$ 9,05	0,762
Sexo, feminino (%)	86 (56,2)	71 (45,5)	41 (27,0)	<0,001
Raça, autodeclarada (%)				0,223
Branco	47 (27,3)	38 (23,5)	44 (27,3)	
Negro	35 (20,3)	27 (16,7)	24 (14,9)	
Pardo	85 (49,4)	84 (51,9)	79 (49,1)	
Asiático	3 (1,7)	11 (6,8)	8 (5,0)	
Nativo Brasileiro / Indígena	2 (1,2)	2 (1,2)	6 (3,7)	
Educação, anos	5,10 $\pm$ 1,98	5,63 $\pm$ 1,92	5,40 $\pm$ 2,04	0,046
Renda familiar, salário mínimo	5,11 $\pm$ 2,67	5,57 $\pm$ 2,93	5,49 $\pm$ 2,98	0,289
Hábito de fumar (%)	83 (54,2)	73 (46,8)	80 (52,6)	0,386
Pressão arterial sistólica, mmHg	125,45 $\pm$ 16,33	125,68 $\pm$ 17,91	125,58 $\pm$ 18,30	0,993
Pressão arterial diastólica, mmHg	75,27 $\pm$ 6,93	75,51 $\pm$ 6,91	75,48 $\pm$ 8,04	0,890
Índice de massa corporal, kg/m ²	30,24 $\pm$ 5,64	29,32 $\pm$ 4,97	28,14 $\pm$ 5,06	0,002
Duração do diabetes desde o diagnóstico, anos	6,69 $\pm$ 6,44	7,49 $\pm$ 7,48	6,42 $\pm$ 6,10	0,639
Colesterol total mg/dL	209,78 $\pm$ 36,52	212,16 $\pm$ 39,35	221,34 $\pm$ 53,08	0,051
HDL-C, mg/dL	52,42 $\pm$ 13,76	52,26 $\pm$ 14,41	50,76 $\pm$ 13,94	0,521
LDL-C, mg/dL	96,90 $\pm$ 29,17)	107,43 $\pm$ 28,68	118,53 $\pm$ 38,70	<0,001
Triglicerídeos, mg/dL	150 [98, 217]	130 [94, 185]	118 [89, 171]	0,001
Lipoproteína(a), mg/dL	6,16 $\pm$ 4,50	6,24 $\pm$ 4,57	6,10 $\pm$ 4,67	0,962
Depuração de creatinina, mL/min/1,73m ²	99,2 [86,8, 117]	97,6 [82,8, 118]	103,7 [82,6, 127]	0,243
hsPCR, mg/dL	3,08 [1,15, 6,49]	1,94 [0,97, 4,74]	1,90 [0,92, 3,77]	0,003
Insulina, mIU /L	9,9 [5,4, 16,4]	9,0 [5,4, 13,7]	7,7 [4,4, 13,2]	0,086

HbA1c, %	6,56 ± 1,57	6,41 ± 1,49	6,23 ± 1,14)	0,119
Partículas HDL				
HDLp1, mg/dL	0,99 ± 0,67	3,00 ± 0,52	5,34 ± 1,28	<0,001
HDLp2, mg/dL	13,15 ± 3,40	12,24 ± 2,75	11,53 ± 3,17	<0,001
HDLp3, mg/dL	4,55 ± 2,57	3,53 ± 1,80	2,72 ± 1,81	<0,001
HDLp4, mg/dL	1,70 ± 1,10	1,64 ± 0,91	1,68 ± 0,89	0,854
HDLp5, mg/dL	0,91 ± 0,84	0,81 ± 0,64	0,59 ± 0,58	<0,001
HDLp6, mg/dL	0,79 ± 1,01	0,69 ± 0,97	0,48 ± 0,70	0,007
HDLp7, mg/dL	0,24 ± 0,40	0,21 ± 0,26	0,22 ± 0,31	0,707
CAC incidente ou progressão do CAC em 5 anos (%)	37 (24,2)	46 (29,5)	60 (39,5)	0,009

CACS, pontuação de cálcio da artéria coronária

DP, desvio padrão

Lp (a), Lipoproteína(a)

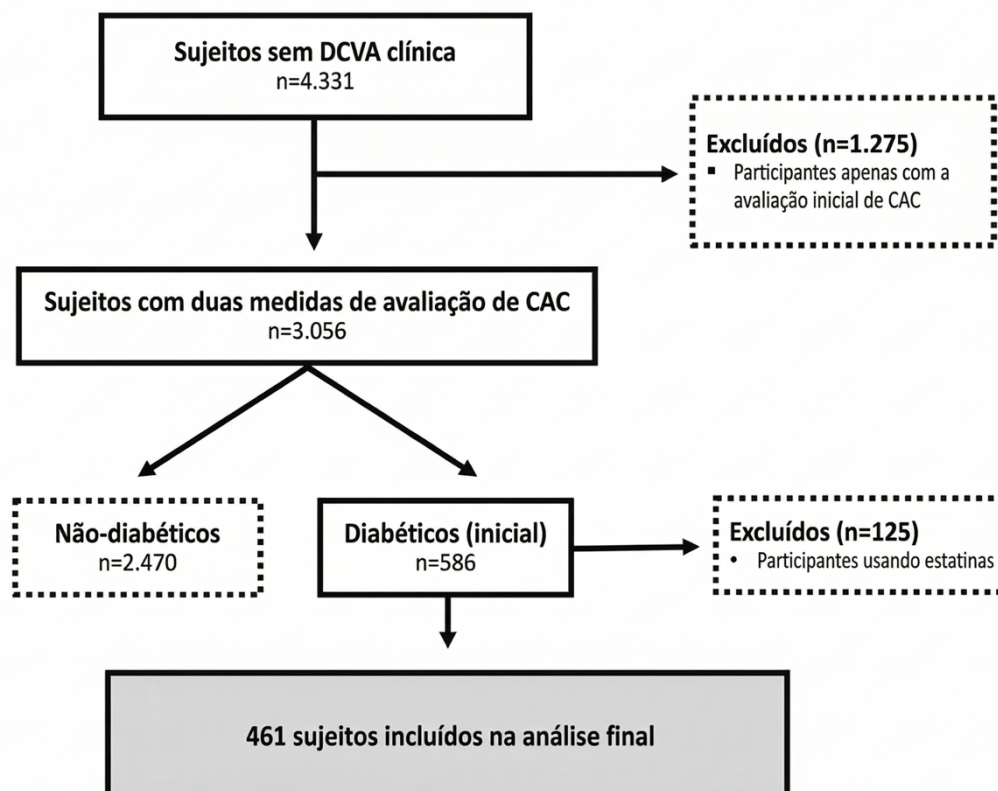
hsPCR: Proteína C-Reativa ultrasensível

Os dados são médias ± DP para variáveis distribuídas normalmente, medianas (IQR) para dados não paramétricos ou n (%)

Os valores de p são para tendência entre os 3 grupos. Análise estatística: χ^2 para dados categóricos; ANOVA ou Kruskal–Wallis para variáveis contínuas

† Incidência ou progressão do CACS: número absoluto (n) e a proporção (%)

Figura 4. Fluxograma do estudo.



Nesse subgrupo observou-se que uma maior proporção de homens estava presente no primeiro tercil de HDLp1 em comparação ao terceiro tercil (56% vs. 27%; $p < 0,001$). O terceiro tercil apresentou ainda menor índice de massa corporal ($p = 0,002$), menores níveis de triglicerídeos ($p = 0,001$) e proteína C-reativa de alta sensibilidade ($p = 0,003$), porém níveis mais elevados de LDL-C ($p < 0,001$). Além disso, níveis mais elevados de HDLp1 também apresentaram maiores concentrações das demais subfrações de HDL (HDLp2–HDLp7).

Para a construção dos modelos multivariáveis, realizou-se inicialmente a triagem das variáveis preditoras potenciais. As covariáveis candidatas, selecionadas com base em relevância clínica e evidência prévia, foram submetidas ao procedimento de regressão logística *stepwise* bidirecional, com seleção final baseada no Critério de Informação de Akaike (AIC). As variáveis que mantiveram associação com a incidência ou progressão de CACS após esse procedimento foram selecionadas para compor os modelos multivariáveis.

A partir dessas variáveis, foi construído o modelo de regressão logística multivariável ajustado para potenciais fatores de confusão, incluindo idade, sexo, pressão arterial sistólica, LDL-C, triglicerídeos, tabagismo, índice de massa corporal, depuração de creatinina e proteína C-reativa de alta sensibilidade (Tabela 4).

No modelo ajustado, níveis mais elevados de HDLp1 permaneceram significativamente associados à incidência de CAC, com OR de 1,47 (IC 95% 1,23–1,76; $p < 0,001$). Adicionalmente, observou-se que a cronicidade da exposição metabólica influenciou o desfecho, sendo que cada incremento de 5 anos na duração do diagnóstico de diabetes associou-se a uma OR ajustada de 1,20 (IC 95% 1,05–1,39; $p < 0,01$) para incidência de calcificação coronária (Tabela 4).

Tabela 4. Regressão logística multivariável para prever a incidência de CAC após 5,1 anos (DP 0,9) de acompanhamento.

CAC = 0 na linha de base (n = 461) com 143 eventos (CACS incidente) após 5,1 anos				
Modelo de linha de base – AUROC 0,651 (IC 95% 0,597-0,705)				
	OR	IC 95%		p
		Inferior	Superior	
Idade (por 10 anos)	1,343	1,255	1,433	<0,0001
Gênero (masculino vs feminino)	0,693	0, 592	0, 810	0,0045
Pressão arterial sistólica (por 10 mmHg)	1,111	1,064	1,160	0,0047
Colesterol LDL (por 1 mmol/L)	1,220	1,131	1,308	0,0011
Triglicerídeos (por 1 mmol/L)	1,068	1,009	1,150	0,0396
Fumar (sim vs não)	1,380	1,188	1,603	0,0252
IMC (por 10 kg/m ²)	1,091	1,025	1,258	0,0284
Depuração de creatinina (por 10 mL/min/1,73 m ²)	1,043	1,002	1,100	0,0406
hsCRP (por 10mg/dL)	1.071	1.004	1.231	0,0385
HbA1c (por 1%)	1,237	1,149	1,333	<0,0001
Modelo de linha de base + HDLp1 – AUROC 0,684 (IC 95% 0,631 - 0,736)				
HDLp1 (por 1 mg/L)	1.477	1.123	1.955	0,005

IMC, Índice de massa corporal
 hsCRP, proteína C reativa de alta sensibilidade
 CAC, Cálculo da artéria coronária
 CACS, pontuação de cálcio da artéria coronária
 DP, desvio padrão
 Lp (a), Lipoproteína(a)
 IC, Intervalo de confiança
 HDLp1, partículas de HDL com 7 a 8 nm
 AUROC, área sob a característica operacional do receptor
 OR, Razão de chances

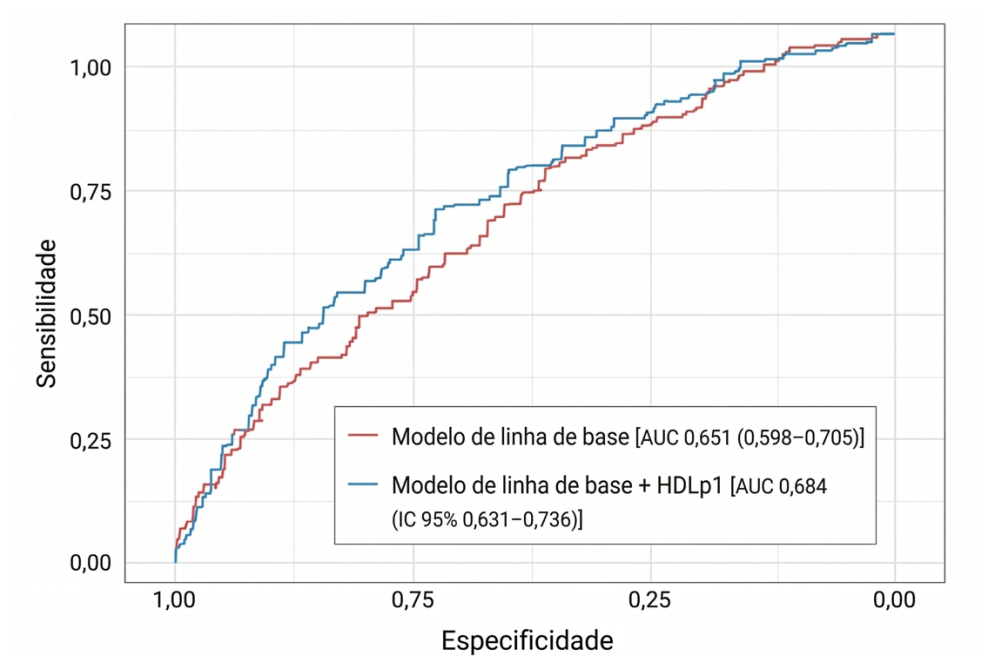
A capacidade discriminatória dos modelos foi avaliada por meio da área sob a curva ROC. A inclusão do HDLp1 esteve associada a melhora na discriminação de CAC incidente em diabéticos em relação ao modelo na linha de base, conforme demonstrado na Tabela 5. A comparação entre as curvas ROC, realizada pelo teste

de DeLong, evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os modelos. A representação gráfica das curvas ROC está apresentada na Figura 5.

Tabela 5. Comparação da capacidade discriminatória dos modelos para predição de incidência de CAC.

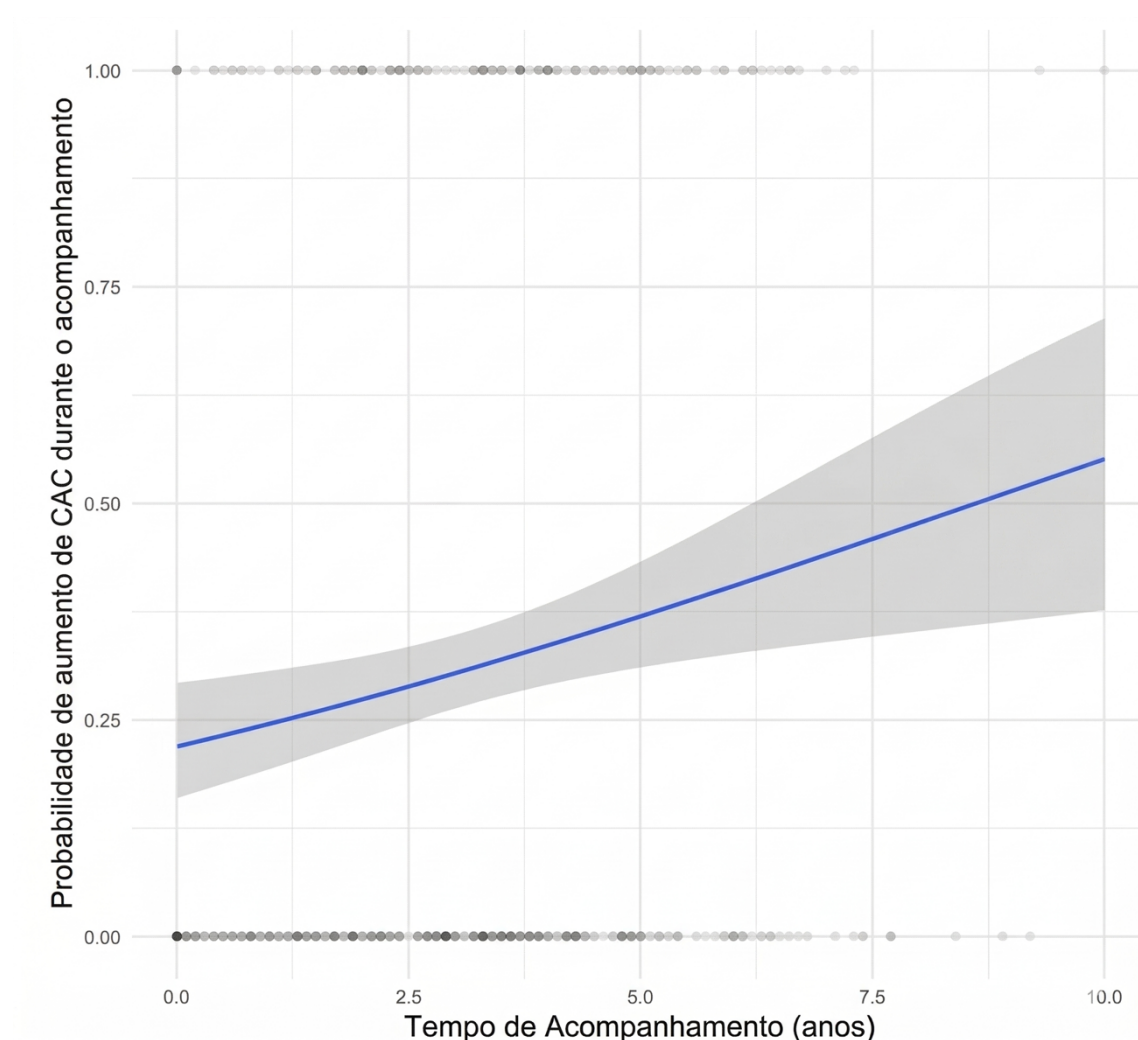
Modelo	AUROC	IC 95%	p (DeLong)
Modelo de linha de base	0,651	0,597 – 0,705	-
Modelo de linha de base + HDLp1	0,684	0,631 – 0,736	0,027

Figura 5. Curva ROC para predição de CAC incidente após 5,1 anos de seguimento, comparando modelos de regressão logística multivariável com e sem a inclusão de partículas de HDL de 7–8 nm (HDLp1).



A análise por *spline* cúbica restrita demonstrou uma associação consistente entre o aumento dos níveis plasmáticos de HDLp1 e o risco de incidência/progressão de CAC, ao longo de um seguimento médio de 5,1 anos (Figura 6).

Figura 6. *Spline* cúbica restrita da probabilidade de incidência de CAC ao longo de 5,1 anos de seguimento, segundo os níveis plasmáticos basais de HDLp1 (7–8 nm).



Em modelo de regressão logística multivariável ajustado para fatores de risco clássicos, o 3º tercil de HDLp1 esteve associado a maior risco de CACS incidente em comparação aos tercis médio (2º) e inferior (1º), conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação multivariável entre tercís de HDLp1 e o risco de CACS incidente após um acompanhamento de $5,1 \pm 0,9$ anos

	OR	IC 95%		Valor de p	
		Inferior	Superior		
Níveis plasmáticos de HDLp1 (categórico)					
2º vs 1º tercil	1,552	1,151	2,099	0,0039	
3º vs 1º tercil	2,404	1,323	3,408	<0,001	

Esse achado foi consistente com a análise de reclassificação de risco. A inclusão do HDLp1 no modelo resultou em melhora da classificação dos indivíduos quanto ao risco de incidência/progressão de CAC, com índice de reclassificação líquida (NRI) de 13,6% (NRI = 0,136; IC 95%: 0,028–0,188; $p = 0,004$), conforme apresentado na Tabela 7. Entre os indivíduos com CAC incidente, 17% foram reclassificados para categorias de maior risco, enquanto 9,5% foram reclassificados para categorias de menor risco.

Tabela 7. Melhoria líquida de reclassificação (NRI) para incidência ou progressão de CAC, considerando o limite de baixo risco em 5% e o limite de alto risco em 20%

Parâmetro	Estimativa/Proporção	IC 95%
NRI total	0,136	0,024 – 0,188
NRI+ (eventos)	0,075	0,015 – 0,129
NRI– (não eventos)	0,062	0,009 – 0,099
Reclassificação , indivíduos com evento (CAC incidente/progressão)		
Reclassificação para maior risco	0,170	0,121 – 0,227
Reclassificação para menor risco	0,095	0,073 – 0,155

Reclassificação , indivíduos sem evento		
Reclassificação para maior risco	0,166	0,106 – 0,173
Reclassificação para menor risco	0,105	0,070 – 0,134

8 DISCUSSÃO

Nosso estudo propõe um modelo integrado para a predição da incidência e progressão do escore de cálcio arterial coronariano (CAC) em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), no qual a incorporação dos tercís de concentração plasmática da subfração HDLp1 aos fatores de risco tradicionais resultou em melhora significativa da capacidade discriminatória e de reclassificação de risco. A adição do HDLp1 permitiu a reclassificação correta de 13,6% dos indivíduos, reforçando seu valor incremental em relação aos modelos convencionais (24).

Ainda que o CAC seja amplamente reconhecido como um marcador de aterosclerose subclínica e um preditor consistente de eventos cardiovasculares, sua interpretação deve ser contextualizada dentro de sua natureza estrutural. O CAC reflete estágios relativamente tardios da aterogênese, nos quais a calcificação já se encontra estabelecida na parede arterial. Dessa forma, a dependência exclusiva do CAC pode subestimar indivíduos que se encontram em fases mais precoces da doença, caracterizadas por alterações funcionais ainda não traduzidas em calcificação detectável por imagem. Esse aspecto assume particular relevância em indivíduos com DM2, nos quais a progressão da aterosclerose tende a ocorrer de forma mais acelerada e precoce, podendo anteceder em até uma década o observado em indivíduos não diabéticos (29).

Os resultados do presente estudo sugerem que a quantificação da subfração HDLp1 permite capturar dimensões da fisiopatologia aterosclerótica que não são acessadas pelo CAC. Enquanto o CAC mensura a carga estrutural da doença, o HDLp1 parece refletir alterações funcionais precoces do metabolismo lipoproteico, particularmente relacionadas à eficiência do transporte reverso de colesterol (4, 6, 20, 21).

Dessa forma, a integração entre ambos os marcadores configura um modelo conceitual complementar, no qual alterações funcionais precedem e potencialmente modulam a evolução estrutural da doença aterosclerótica.

Esse achado é consistente com o aumento observado na capacidade discriminatória do modelo, com elevação da AUROC após a inclusão do HDLp1, além da melhora significativa na reclassificação de risco, evidenciada pelo NRI de 13,6%. Em conjunto, esses resultados sustentam a hipótese de que a avaliação isolada de marcadores estruturais pode ser insuficiente para capturar a heterogeneidade do risco cardiovascular em indivíduos com DM2, reforçando a necessidade de abordagens multimodais.

Do ponto de vista fisiopatológico, a interpretação do papel do HDLp1 exige uma análise mais aprofundada. Tradicionalmente, partículas menores de HDL, como a subfração pré-beta-1 (HDLp1), são consideradas altamente eficientes na etapa inicial do transporte reverso de colesterol, particularmente por meio do efluxo mediado pelo transportador ABCA1 (1,3).

No entanto, os achados do presente estudo revelam uma associação paradoxal, na qual níveis mais elevados de HDLp1 se correlacionam com maior risco de incidência/progressão de CAC, com aumento de até 140% (*odds ratio* [OR] = 2, 40; IC 95%: 1, 32–3, 40; $p < 0,001$) no risco no terceiro tercil.

Esse paradoxo pode ser interpretado à luz das alterações metabólicas características do DM2. Em estados de resistência à insulina e hiperglicemia crônica, ocorre uma modificação estrutural e funcional das partículas de HDL, incluindo glicação da apolipoproteína A-I, redução da atividade da LCAT e alterações na composição proteica da lipoproteína (4)(6). Esse conjunto de alterações compromete a maturação adequada das partículas de HDL, resultando em acúmulo de formas

imaturas, como o HDLp1, que, embora numericamente elevadas, apresentam funcionalidade reduzida (30, 31, 32).

Nesse contexto, níveis elevados de HDLp1 não devem ser interpretados como um marcador de eficiência do transporte reverso de colesterol, mas sim como um marcador indireto de disfunção na maturação da HDL. Esse conceito é corroborado pelos dados observados na coorte, nos quais maiores concentrações de HDLp1 se associaram a menores níveis das subfrações maiores (HDLp2–HDLp7), sugerindo um comprometimento no processo de transição estrutural dessas partículas (16).

A análise das características basais entre os tercís de concentração plasmática de HDLp1 revelou achados que, à primeira vista, parecem contraintuitivos, mas que, quando interpretados de forma integrada, oferecem *insights* relevantes sobre a dinâmica funcional das partículas de HDL. Observou-se que o terceiro tercil concentrou maior proporção de indivíduos do sexo feminino, além de apresentar menores valores de índice de massa corporal, triglicerídeos e proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCR). Esse perfil, classicamente associado a menor risco cardiometabólico, contrasta com o aumento significativo do risco de incidência/progressão de CAC observado nesse mesmo grupo.

Essa aparente dissociação entre o perfil metabólico “favorável” e o maior risco aterosclerótico sugere que a concentração de HDLp1 pode estar capturando dimensões do risco cardiovascular que não são adequadamente refletidas por marcadores tradicionais. Uma hipótese plausível é que, nesse subgrupo, o aumento do HDLp1 represente não um estado de eficiência funcional, mas sim um acúmulo de partículas imaturas decorrente de falha na sua conversão para formas mais maduras e funcionalmente competentes (30, 31). Esse fenômeno pode ser particularmente relevante em mulheres, especialmente no contexto pós-menopausa, em que

alterações hormonais impactam diretamente o metabolismo lipoproteico e a atividade de enzimas-chave como a LCAT (33).

A disfunção na maturação das partículas de HDL encontra respaldo adicional na observação concomitante de redução progressiva das subfrações maiores (HDLp2–HDLp7) nos indivíduos com maiores níveis de HDLp1. Esse padrão sugere um desbalanço no fluxo de transformação das partículas ao longo do espectro de maturação, reforçando a hipótese de que o HDLp1 elevado, nesse contexto, constitui um marcador de deficiência do transporte reverso de colesterol, e não de sua eficiência.

À luz dessa disfunção no processo de maturação lipoproteica, torna-se necessário investigar os determinantes biológicos subjacentes capazes de modular esse fenômeno. Nesse sentido, a predominância de mulheres no terceiro tercil de HDLp1, associada a um perfil metabólico aparentemente mais favorável, mas paradoxalmente vinculada a maior risco de progressão de CAC, sugere a possível influência de fatores hormonais na regulação do metabolismo lipoproteico. Dentre esses fatores, a transição menopausal emerge como um eixo fisiopatológico central para a compreensão dos achados.

O estrogênio desempenha função relevante na regulação da homeostase lipídica, influenciando a expressão de genes envolvidos na maturação da HDL, com destaque para o gene da LCAT. A atividade dessa enzima promove a esterificação do colesterol livre presente nas partículas discoidais de HDL, favorecendo sua conversão em formas esféricas maduras e funcionalmente ativas. Dados experimentais indicam que o estrogênio modula positivamente a expressão da LCAT, contribuindo para a manutenção da eficiência do transporte reverso de colesterol (33).

Nesse contexto, a LCAT não apenas desempenha papel central na maturação das partículas de HDL, mas também emerge como um potencial alvo terapêutico na modulação da funcionalidade lipoproteica. Estratégias voltadas à melhora de sua atividade vêm sendo exploradas em diferentes níveis. Estudos prévios que recorreram à reposição enzimática com LCAT recombinante demonstraram normalização de parâmetros lipídicos e melhora de marcadores clínicos, porém com efeitos de curta duração, o que reflete a baixa meia-vida da enzima na circulação (34).

Diante dessa limitação, abordagens baseadas em terapia gênica e medicina regenerativa têm sido desenvolvidas com o objetivo de promover produção sustentada de LCAT. Estudos recentes utilizando adipócitos autólogos geneticamente modificados demonstraram aumento prolongado da atividade plasmática da enzima por períodos superiores a 200 semanas, sugerindo o potencial dessas estratégias para restaurar de forma mais duradoura o transporte reverso de colesterol (35).

Esses achados reforçam a relevância da LCAT não apenas como marcador funcional da maturação da HDL, mas como um eixo terapêutico promissor na modulação da aterogênese, particularmente em contextos caracterizados por acúmulo de subfrações imaturas, como observado no presente estudo (36, 37, 38, 39).

Durante a transição menopausal, a redução progressiva dos níveis de estradiol leva à diminuição da atividade da LCAT, resultando em comprometimento da maturação das partículas de HDL. Como consequência, ocorre acúmulo de subfrações pequenas refletindo um estado de interrupção do fluxo fisiológico do transporte reverso de colesterol. Esse fenômeno é corroborado por evidências de grandes coortes longitudinais, como o estudo SWAN, que demonstram que, embora os níveis de HDL-C total possam permanecer estáveis ou até aumentar durante a

menopausa, há uma redistribuição significativa das subfrações, com aumento desproporcional de partículas pequenas e redução da capacidade funcional de efluxo de colesterol (40).

Adicionalmente, estudos de lipidômica e proteômica indicam que a menopausa está associada a alterações qualitativas nas partículas de HDL, incluindo enriquecimento em triglicerídeos e modificação da composição proteica, o que compromete suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (40, 41,42).

Outro aspecto relevante refere-se ao impacto funcional dessas alterações. Em mulheres pós-menopausa, as partículas menores de HDL tornam-se mais suscetíveis à glicação e oxidação, especialmente no contexto do DM2. Esse processo leva à perda de funções essenciais da HDL, como a capacidade antioxidante mediada pela enzima paraoxonase-1 (PON1), cuja atividade também se encontra reduzida nesse período (40, 41).

Assim, o acúmulo de HDLp1 observado no presente estudo pode ser interpretado como um biomarcador integrado de disfunção lipoproteica e hormonal, no qual a interação entre deficiência estrogênica, resistência à insulina e inflamação crônica resulta em um fenótipo caracterizado por alta concentração de partículas, porém baixa funcionalidade.

Esse conceito é reforçado por evidências de que a terapia de reposição hormonal pode restaurar parcialmente a atividade da LCAT e promover a redistribuição das subfrações de HDL em direção a partículas maiores e mais funcionais (33).

Dessa forma, a interpretação dos níveis de HDLp1 em mulheres, particularmente no período pós-menopausa, deve considerar não apenas sua

concentração, mas também o contexto hormonal subjacente, o que reforça a necessidade de abordagens individualizadas na avaliação do risco cardiovascular.

Embora esses achados reforcem o papel dos determinantes hormonais na modulação da funcionalidade da HDL, a heterogeneidade observada na progressão da aterosclerose sugere que outros eixos biológicos, para além do ambiente hormonal, também exercem influência relevante sobre esse processo. Nesse contexto ampliado, a distribuição desigual de indivíduos de etnia asiática entre os grupos analisados, com maior proporção no estrato de diabéticos com CAC ≥ 1 , levanta uma questão importante acerca da contribuição de fatores étnico-raciais na modulação do risco aterosclerótico.

Tal achado sugere que fatores genéticos e ambientais podem modular de forma significativa a interação entre metabolismo glicídico, disfunção lipoproteica e calcificação coronariana. O chamado “paradoxo asiático” descreve a observação de que populações de origem asiática apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 e suas complicações cardiovasculares, mesmo em níveis de IMC considerados normais segundo critérios ocidentais. Essa vulnerabilidade metabólica está associada a uma maior proporção de gordura visceral, maior lipotoxicidade hepática, bem como disfunção precoce das células beta pancreáticas, o que favorece o desenvolvimento de resistência à insulina e inflamação sistêmica (42, 43).

Além disso, estudos indicam que indivíduos asiáticos apresentam maior predisposição à disfunção endotelial e ao estresse oxidativo, fatores que aceleram a progressão da aterosclerose. No contexto do presente estudo, esses mecanismos podem atuar de forma sinérgica com as alterações qualitativas das partículas de HDL,

particularmente o possível acúmulo de HDLp1, amplificando o risco de progressão de CAC (42, 43).

No cenário brasileiro, esse fenômeno é ainda mais complexo devido ao processo de ocidentalização, especialmente em populações nipo-brasileiras. Evidências desta análise do ELSA-Brasil sugere que esses indivíduos apresentam maior prevalência de diabetes e resistência insulínica em comparação a seus pares residentes no Japão, sugerindo que a interação entre predisposição genética e ambiente obesogênico provavelmente exerce papel na expressão do fenótipo metabólico.

Estudos internacionais, como o MASALA, reforçam essa hipótese ao demonstrar que populações asiáticas vivendo em ambientes ocidentalizados apresentam taxas mais elevadas de progressão de CAC, mesmo após ajuste para fatores de risco tradicionais. Esses achados sugerem que o diabetes atua como um potente amplificador dos processos aterogênicos nesse grupo, possivelmente por meio da intensificação de vias inflamatórias, disfunção endotelial e alterações qualitativas nas lipoproteínas (43).

Corroborando essa complexidade, modelos ajustados demonstraram que o HDL-C apresenta associação direta com a densidade do CAC, enquanto a circunferência abdominal associa-se de forma inversa a esse parâmetro. Por outro lado, em relação ao volume de CAC, foram observadas associações diretas com índice de massa corporal, hipertensão arterial, uso de estatinas, presença de diabetes e resistência insulínica avaliada pelo HOMA-IR (42, 43).

Nesse contexto, é plausível que, em indivíduos asiáticos com DM2, o acúmulo de subfrações pequenas e disfuncionais de HDL, como o HDLp1, desempenhe papel

ainda mais relevante na progressão da aterosclerose, contribuindo para a heterogeneidade observada nos desfechos cardiovasculares.

Essa heterogeneidade na expressão do risco aterosclerótico, modulada por interações entre fatores metabólicos, hormonais e étnicos, sugere que diferentes vias lipoproteicas podem responder de maneira distinta ao ambiente metabólico característico do DM2. Nesse sentido, a análise de outras frações lipoproteicas torna-se fundamental para compreender de forma mais abrangente essas adaptações biológicas (43, 44).

Sob essa perspectiva, outro achado que merece aprofundamento refere-se aos níveis reduzidos de lipoproteína(a) [Lp(a)] observados nos indivíduos com DM2 em comparação aos não diabéticos, um resultado que, à primeira análise, parece contradizer o maior risco aterosclerótico esperado nessa população. No entanto, evidências contemporâneas sugerem que essa associação paradoxal não apenas é biologicamente plausível, como também reflete uma interação complexa entre metabolismo glicídico e regulação hepática das lipoproteínas.

Estudos populacionais recentes demonstram uma associação inversa entre níveis de Lp(a) e risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2, sugerindo que concentrações mais baixas dessa lipoproteína podem estar relacionadas a estados de hiperinsulinemia compensatória e resistência à insulina. Do ponto de vista mecanístico, a insulina parece exercer efeito inibitório direto sobre a expressão do gene LPA, responsável pela síntese da Lp(a), levando à redução de sua produção hepática (45).

Esse fenômeno sugere que os níveis reduzidos de Lp(a) observados em indivíduos com DM2 não representam um estado de menor risco cardiovascular, mas sim um fenômeno metabólico secundário à hiperinsulinemia crônica. Em outras

palavras, a diminuição da Lp(a) pode ser interpretada como um marcador indireto da intensidade da resistência à insulina, e não como um fator protetor *per se* (45, 46).

Além disso, a interpretação desse achado deve considerar que a Lp(a) possui um componente genético fortemente determinante, relativamente estável ao longo da vida. Assim, variações observadas em contextos metabólicos específicos sugerem que fatores ambientais e hormonais podem modular sua expressão de maneira mais dinâmica do que previamente reconhecido. Essa modulação pode envolver não apenas a ação direta da insulina, mas também alterações inflamatórias e oxidativas associadas ao DM2, que influenciam a estabilidade e o catabolismo da partícula (45, 46).

Do ponto de vista clínico, esse achado desafia a utilização isolada da Lp(a) como marcador de risco cardiovascular em indivíduos com DM2, indicando que sua interpretação deve ser contextualizada dentro do ambiente metabólico global (47).

Essa necessidade de contextualização reforça o conceito central emergente do presente estudo: a avaliação do risco cardiovascular em populações metabolicamente complexas requer a integração de múltiplos biomarcadores que capturem tanto dimensões estruturais quanto funcionais da doença aterosclerótica.

9 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo apresenta limitações que devem ser consideradas na interpretação dos achados. A exclusão de indivíduos em uso de estatinas, embora metodologicamente justificada pela necessidade de reduzir interferências farmacológicas no metabolismo lipoproteico, pode restringir a generalização dos resultados, uma vez que essas medicações constituem o padrão terapêutico na população com diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Em contrapartida, essa estratégia permitiu examinar a dinâmica das subfrações de HDL e a progressão do escore de cálcio arterial coronariano (CAC) em um cenário sem modulação farmacológica direta.

A natureza observacional do estudo impõe limitações adicionais à inferência causal entre os níveis de HDLp1 e a progressão da aterosclerose. Apesar do ajuste para múltiplos fatores de confusão, a possibilidade de confundimento residual persiste, sobretudo diante da complexidade metabólica inerente ao DM2. Soma-se a isso a ausência de medidas diretas da funcionalidade da HDL, o que restringe a interpretação mecanística dos achados. A quantificação das subfrações lipoproteicas fornece uma estimativa indireta da eficiência do transporte reverso de colesterol; entretanto, parâmetros funcionais, como a capacidade de efluxo de colesterol, a atividade da LCAT e a atividade da paraoxonase-1 (PON1), poderiam ampliar a caracterização do fenótipo lipoproteico observado.

Essas limitações delineiam caminhos para investigações futuras. A integração de medidas funcionais da HDL à avaliação do risco cardiovascular pode ser determinante para validar o HDLp1 como marcador de disfunção lipoproteica. Nesse sentido, métodos avançados de análise de subfrações lipoproteicas, como a espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), tendem a oferecer maior

precisão na caracterização do perfil lipoproteico e a ampliar seu potencial de aplicação clínica.

A relevância da LCAT na maturação da HDL também sustenta seu interesse como alvo de investigação translacional. Estratégias voltadas à sua modulação, incluindo reposição enzimática e abordagens de terapia gênica, encontram-se em desenvolvimento. Em paralelo, mecanismos que regulam a biodisponibilidade de proteínas circulantes, como vias de reabsorção mediadas por receptores do tipo *megalin* e *cubilin*, passam a ser considerados possíveis moduladores desse sistema. Embora ainda careçam de validação experimental, esses mecanismos ampliam a compreensão da regulação sistêmica do metabolismo lipoproteico (39, 48).

Achados recentes provenientes de outra análise longitudinal da coorte ELSA-Brasil sugerem que partículas de HDL de tamanho médio foram associadas a menor chance de progressão do CAC, reforçando a necessidade de estudos futuros que comparem, de forma integrada, subfrações pequenas, médias e grandes de HDL, bem como suas propriedades funcionais (49).

A interpretação de biomarcadores lipoproteicos deve, por fim, considerar a heterogeneidade biológica entre subgrupos populacionais. O ELSA-Brasil, enquanto coorte de base populacional, reflete de forma consistente a diversidade e a composição multiétnica da população brasileira, conferindo relevância externa aos achados. Ainda assim, análises estratificadas por sexo e etnia, aliadas à incorporação de determinantes sociais da saúde, podem aprofundar a avaliação do risco cardiovascular, particularmente em indivíduos com DM2, nos quais marcadores tradicionalmente considerados protetores podem assumir significados distintos conforme o contexto biológico.

10 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstra que a associação entre níveis elevados de pequenas partículas de HDL e a progressão do CAC é significativa em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 que não fazem uso de estatinas e não apresentam histórico documentado de doença aterosclerótica cardiovascular. Esse achado sugere que o acúmulo de subfrações imaturas de HDL, como HDLp1, pode refletir disfunção no transporte reverso de colesterol nesse contexto.

Este subgrupo de indivíduos de maior risco pode se beneficiar de monitoramento mais próximo, por meio de exames seriados de CAC, além da possível indicação de terapia com estatinas como estratégia para melhor controle do risco cardiovascular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rosenson RS, Brewer HB, Ansell BJ, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, et al. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13(1):48-60.
2. Sokooti S, Flores-Guerrero JL, Kieneker LM, Heerspink HJL, Connelly MA, Bakker SJL, et al. HDL particle subspecies and their association with incident type 2 diabetes: the PREVEND Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(6):1761-72.
3. Du XM, Kim MJ, Hou L, Le Goff W, Chapman MJ, Van Eck M, et al. HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export. *Circ Res.* 2015;116(7):1133-42.
4. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, Givens EG, Ayers CR, Wedin KE, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2014;371(25):2383-93.
5. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med.* 2006;26(4):847-70.
6. Rosso LG, Lhomme M, Meroño T, Dellepiane A, Sorroche P, Hedjazi L, et al. Poor glycemic control in type 2 diabetes enhances functional and compositional alterations of small, dense HDL3c. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2017;1862(2):188-95.
7. Rysz-Górczyńska M, Banach M. Subfractions of high-density lipoprotein (HDL) and dysfunctional HDL in chronic kidney disease patients. *Arch Med Sci.* 2016;12(4):844-9.
8. Sacks FM, Liang L, Furtado JD, Cai T, Davidson WS, He Z, et al. Protein-defined subspecies of HDLs (high-density lipoproteins) and differential risk of

- coronary heart disease in 4 prospective studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(11):2714-27.
9. Davidson WS, Cooke AL, Swertfeger DK, Shah AS. The difference between high density lipoprotein subfractions and subspecies: an evolving model in cardiovascular disease and diabetes. *Curr Atheroscler Rep.* 2021;23(6):23.
 10. Matera R, Horvath KV, Nair H, Schaefer EJ, Asztalos BF. HDL particle measurement: comparison of 5 methods. *Clin Chem.* 2018;64(3):492-500.
 11. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry.* 1988;27(1):25-9.
 12. Mora S, Otvos JD, Rifai N, Rosenson RS, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation.* 2009;119(7):931-9.
 13. Li J, Vosegaard T, Guo Z. Applications of nuclear magnetic resonance in lipid analyses: an emerging powerful tool for lipidomics studies. *Prog Lipid Res.* 2017;68:37-56. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016378271730036X>
 14. Cole TG, Contois JH, Csako G, McConnell JP, Remaley AT, Devaraj S, et al. Association of apolipoprotein B and nuclear magnetic resonance spectroscopy-derived LDL particle number with outcomes in 25 clinical studies: assessment by the AACC Lipoprotein and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clin Chem.* 2013;59(5):752-70. Available from:
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.196733>
 15. Carvalho LSF, Benseñor IM, Nogueira ACC, Duncan BB, Schmidt MI, Blaha MJ, et al. Increased particle size of triacylglycerol-enriched remnant

- lipoproteins, but not their plasma concentration or lipid content, augments risk prediction of incident type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2021;64(2):385-96.
16. Nobécourt E, Jacqueminet S, Hansel B, Chantepie S, Grimaldi A, Chapman MJ, et al. Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia*. 2005;48(3):529-38. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1655-5>
 17. Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. The conformation of apolipoprotein A-I in high-density lipoproteins is influenced by core lipid composition and particle size: a surface plasmon resonance study. *Biochemistry*. 2000;39(19):5712-21.
 18. Vinagre I, Sánchez-Quesada JL, Sánchez-Hernández J, Santos D, Ordoñez-Llanos J, De Leiva A, et al. Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients: effect of glycemic control and impact of LDL subfraction phenotype. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13(1):34. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-34>
 19. Alluri K, Joshi PH, Henry TS, Blumenthal RS, Nasir K, Blaha MJ. Scoring of coronary artery calcium scans: history, assumptions, current limitations, and future directions. *Atherosclerosis*. 2015;239(1):109-17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.040>
 20. Greenland P, Blaha MJ, Budoff MJ, Erbel R, Watson KE. Coronary calcium score and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(4):434-47.
 21. Budoff MJ, Young R, Burke G, Carr JJ, Detrano RC, Folsom AR, et al. Ten-year association of coronary artery calcium with atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) events: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Eur Heart J*. 2018;39(25):2401-8.

22. Dzaye O, Dardari ZA, Cainzos-Achirica M, Blankstein R, Agatston AS, Duebgen M, et al. Warranty period of a calcium score of zero: comprehensive analysis from MESA. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2021;14(5):990-1002.
23. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, et al. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med*. 2008;358(13):1336-45.
24. Ferket BS, Hunink MGM, Masharani U, Max fW, Yeboah J, Fleischmann KE. Long-term predictions of incident coronary artery calcium to 85 years of age for asymptomatic individuals with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2021;44(7):1664-71.
25. Grinberg T, Eisen A, Talmor-Barkan Y, Kornowski R, Hamdan A, Witberg G, et al. Novel plasma biomarkers of coronary artery calcium incidence or progression: insights from the prospective multi-ethnic Dallas Heart Study cohort. *Atherosclerosis*. 2024;390:117469.
26. Cardoso R, Generoso G, Staniak HL, Foppa M, Duncan BB, Pereira AC, et al. Predictors of coronary artery calcium incidence and progression: the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Atherosclerosis*. 2020;309:8-15.
27. Aquino EML, Barreto SM, Bensenor IM, Carvalho MS, Chor D, Duncan BB, et al. Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): objectives and design. *Am J Epidemiol*. 2012;175(4):315-24.
28. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte MJ, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15(4):827-32.

29. Kramer CK, Zinman B, Gross JL, Canani LH, Rodrigues TC, Azevedo MJ, et al. Coronary artery calcium score prediction of all cause mortality and cardiovascular events in people with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2013;346:f1654.
30. Rosenson RS, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Fazio S, Hussain MM, Kontush A, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem*. 2011;57(3):392-410.
31. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, et al. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(11):2181-7.
32. Cardner M, Yalcinkaya M, Goetze S, Luca E, Balaz M, Hunjadi M, et al. Structure-function relationships of HDL in diabetes and coronary heart disease. *JCI Insight*. 2020;5(1):e131491.
33. He W, Wang M, Zhang X, Wang Y, Zhao D, Li W, et al. Estrogen induces LCAT to maintain cholesterol homeostasis and suppress hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res*. 2024;84(15):2417-31.
34. Shamburek RD, Bakker-Arkema R, Auerbach BJ, Krause BR, Homan R, Amar MJ, et al. Familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency: first-in-human treatment with enzyme replacement. *J Clin Lipidol*. 2016;10(2):356-67.
35. Kuroda M, Hori M, Maezawa Y, Kubota Y, Mitsukawa N, Shiko Y, et al. LCAT-trial-24 weeks: protocol for a clinical study to evaluate the safety of regenerative medicine and gene therapy by the autologous transplantation of human

- lecithin:cholesterol acyltransferase gene-transduced human pre-adipocytes. *Contemp Clin Trials Commun.* 2022;28:100946.
36. Freeman LA, Karathanasis S, Remaley AT. Novel LCAT-based therapeutic approaches. *Curr Opin Lipidol.* 2020;31(2):71-79.
 37. Rousset X, Vaisman B, Amar M, Sethi AA, Remaley AT. Lecithin:cholesterol acyltransferase: from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2009;16(2):163-71.
 38. Hui N, Barter PJ, Ong KL, Rye KA. Altered HDL metabolism in metabolic disorders: insights into the therapeutic potential of HDL. *Clin Sci (Lond).* 2019;133(21):2221-35.
 39. Farbstein D, Levy AP. HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012;10(3):353-61.
 40. El Khoudary SR, Chen X, Nasr A, Billheimer J, Brooks MM, McConnell D, et al. HDL (high-density lipoprotein) subclasses, lipid content, and function trajectories across the menopause transition: SWAN-HDL Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(2):951-61.
 41. Mogarekar MR, Kulkarni SK. Small Dense Low Density Lipoprotein Cholesterol, Paraoxonase 1 and Lipid Profile in Postmenopausal Women: Quality or Quantity? *Arch Med Res [Internet].* 2015;46(7):534–8. Available from:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0188440915002398>
 42. Pursnani S, Merchant M. South Asian ethnicity as a risk factor for coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2020;315:126-30.
 43. Al Rifai M, Kanaya AM, Kandula NR, Patel J, Al-Mallah MH, Budoff M, et al. Association of coronary artery calcium density and volume with predicted atherosclerotic cardiovascular disease risk and cardiometabolic risk factors in

- South Asians: the Mediators of Atherosclerosis in South Asians Living in America (MASALA) Study. *Curr Probl Cardiol.* 2023;48(4):101105.
44. Unnikrishnan R, Anjana RM, Mohan V. Diabetes in South Asians: is the phenotype different? *Diabetes.* 2014;63(1):53-5.
 45. Yeung MW, Said MA, van de Vegte YJ, Verweij N, Dullaart RPF, van der Harst P. Associations of very low lipoprotein(a) levels with risks of new-onset diabetes and non-alcoholic liver disease. *Atheroscler Plus.* 2024;57:19-25.
 46. Corral P, Matta MG, Schreier L. Are lipoprotein(a) levels decreased in insulin resistance and type 2 diabetes? *Curr Opin Lipidol.* 2025;36(4):179-84.
 47. Hermans MP, Ahn SA, Rousseau MF. The mixed benefit of low lipoprotein(a) in type 2 diabetes. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):171.
 48. Dugué-Pujol S, Rousset X, Château D, Pastier D, Klein C, Demeurie J, et al. Apolipoprotein A-II is catabolized in the kidney as a function of its plasma concentration. *J Lipid Res [Internet].* 2007 Oct 1;48(10):2151–61. Available from: <https://doi.org/10.1194/jlr.M700089-JLR200>.
 49. Stephanus AD, Campos-Staffico AM, Bittencourt MS, Blaha MJ, Toth PP, Jones SR, et al. Lipoprotein Subfractions and Coronary Artery Calcium Progression: Insights from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Eur J Prev Cardiol.* 2026 Mar;

ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2025, **110**, e4153–e4157
<https://doi.org/10.1210/clinem/dgaf215>
 Advance access publication 3 April 2025
 Clinical Research Article



Plasma Levels of Small HDL Particles Are Associated With Coronary Atherosclerosis Progression in Adults With Diabetes

Bruna S. B. S. Teles,^{1,2} Sergio H. R. Ramalho,³ Márcio S. Bittencourt,⁴ Isabela M. Benseñor,⁴ Michael J. Blaha,⁵ Peter P. Toth,^{5,6} Steven R. Jones,⁵ Raul D. Santos,^{4,7} Paulo A. Lotufo,⁴ and Luiz Sérgio F. de Carvalho^{1,3,8,9,10}; on behalf of the ELSA-Brasil study

¹Medical Sciences Post-graduation Program, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

²Vascular Surgery Unit, Hospital de Base do Distrito Federal, Brasília, DF 70330-150, Brazil

³Internal Medicine and Cardiovascular Unit, Hospital Sírio-Libanês, Brasília, DF 70200-730, Brazil

⁴Center for Clinical and Epidemiological Research, University Hospital, University of São Paulo, São Paulo, SP 01246-90, Brazil

⁵Cardiometabolic Clinic, The Johns Hopkins Ciccarone Center for the Prevention of Heart Disease, Baltimore, MD 21287, USA

⁶Preventive Cardiology, CGH Medical Center, Sterling, IL 61081, USA

⁷Lipid Clinic, Heart Institute (InCor), University of São Paulo, Medical School Hospital, São Paulo, SP 05403-900, Brazil

⁸Laboratory of Data for Quality of Care and Outcomes Research (LaDa:QCOR), Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF 71966-700, Brazil

⁹Cardiometabolic Clinic, Aramari Apo Institute, Brasília, DF 70712-903, Brazil

¹⁰Health Economics and Outcomes Research (HEOR) Department, Clarity Healthcare Intelligence, Campinas, SP 13.087-441, Brazil

Correspondence: Luiz Sérgio Fernandes de Carvalho, MD, MSc, PhD, Laboratory of Data for Quality of Care and Outcomes Research (LaDa:QCOR), Universidade Católica de Brasília, QS 07, Lote 01, Taguatinga Sul, Brasília, DF 71966-700, Brazil, Email: luiz.c.arvalho@p.uchb.br.

Abstract

Context: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a major driver of coronary atherosclerosis progression, yet its impact is highly heterogeneous. Insulin resistance contributes to a complex interplay of metabolic disturbances that accelerate atherogenesis to varying degrees. Identifying biomarkers that refine cardiovascular risk prediction in this population remains a clinical priority.

Objective: To evaluate the association between small high-density lipoprotein (HDL) particle concentration and the incidence/progression of coronary artery calcium (CAC) in individuals with T2DM.

Methods: We analyzed 4331 participants from the ELSA-Brasil cohort. CAC incidence/progression was compared between individuals with and without T2DM. A subgroup of 461 non-statin users with T2DM and no baseline atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) was further assessed for associations between small HDL particles (<8 nm, HDLp1) and CAC outcomes.

Results: Individuals with T2DM showed increased CAC incidence/progression rates compared to nondiabetic participants. Among 461 non-statin users with T2DM, 143 (31.0%) experienced CAC incidence/progression. Higher plasma concentrations of HDLp1 (third tertile) were associated with a 140% (95% CI, 32%–341%; $P < .001$) greater likelihood of CAC incidence/progression compared to the first tertile. The inclusion of HDLp1 significantly improved CAC risk classification, with a net reclassification improvement (NRI) of 13.6% (95% CI, 2.8%–18.8%; $P = .004$).

Conclusion: HDLp1 concentration is significantly associated with CAC incidence/progression in individuals with T2DM and may improve risk discrimination for coronary atherosclerosis progression in this population.

Key Words: type 2 diabetes mellitus, coronary artery calcium, atherosclerosis progression, HDL particles, insulin resistance, cardiovascular risk stratification
Abbreviations: ASCVD, atherosclerotic cardiovascular disease; AUC, area under the curve; CAC, coronary artery calcium; CACS, coronary artery calcium score; CVD, cardiovascular disease; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; LDL, low-density lipoprotein; NMR, nuclear magnetic resonance; NRI, net reclassification improvement; OR, odds ratio; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

Coronary artery calcium (CAC) is a powerful predictor of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD), independent of traditional risk factors and regardless of age, sex, and ethnicity (1). A CAC score of 100 or higher indicates a 7.5-fold greater risk of ASCVD events over 10 years compared to the absence of CAC (2). Equally, individuals with absent CAC (CAC score [CACS] of 0) at baseline who evolve with incident

CAC and who progress with a rise in CAC score after 3 to 7 years from a first assessment are at higher risk of ASCVD events. This impact is more evident among individuals with type 2 diabetes mellitus (T2DM) (3, 4).

While T2DM is associated with a 22% higher likelihood of CAC progression compared to persons without T2DM, factors such as sex, blood pressure, components of the lipid

Received: 8 December 2024. Editorial Decision: 1 April 2025. Corrected and Typeset: 21 April 2025

© The Author(s) 2025. Published by Oxford University Press on behalf of the Endocrine Society. All rights reserved. For commercial re-use, please contact reprints@oup.com for reprints and translation rights for reprints. All other permissions can be obtained through our RightsLink service via the Permissions link on the article page on our site—for further information please contact journals.permissions@oup.com. See the journal About page for additional terms.

profile, and ethnicity also influence this association (3). For instance, a 40-year-old diabetic woman without additional comorbidities has a 12% chance of CAC progression in 5 years, while for a 60-year-old diabetic man with hypertension, the risk jumps to 55% (3).

These data not only highlight a highly heterogeneous progression of atherosclerosis among individuals with T2DM but also indicate that interventions to inhibit atherosclerosis progression are being delayed by over 5 years in a significant number of individuals. Identifying factors associated with 5-year CAC progression and incorporating novel biomarkers may support earlier and more effective primary prevention strategies (5).

Among promising biomarkers, low high-density lipoprotein (HDL) cholesterol efflux capacity and small HDL particle size are associated with increased risk for ASCVD events (6). Smaller HDL particles are functionally impaired secondary to their glycation and oxidation in the setting of T2DM, and this translates into reduced ability to promote cholesterol efflux and prevent low-density lipoprotein (LDL) oxidation. Small HDL particles have been associated with long-term risk of incident ASCVD, but whether this risk is shared in the shorter-term for atherosclerosis progression is unclear (7).

Therefore, we aimed to assess whether HDL particles could improve discriminative ability for CAC incidence/progression on top of classic risk factors among individuals with T2DM from a racially admixed cohort (3, 8).

Methods

ELSA-Brasil is a longitudinal cohort with a racially mixed population of 15 105 individuals with baseline data collected from 2008 to 2010 (9). We first included 4547 individuals with a baseline CACS assessment and excluded 216 due to prior clinical ASCVD. Among the 4331 subjects without clinical ASCVD, 1275 had only a baseline CAC assessment, and 3056 had 2 evaluations (Supplementary Fig. S1) (10). All participants signed an informed consent form, and the ELSA-Brasil study was approved by the Research Ethics Committee (CEP-HUJSP Registration: 659/06-CAAE: 0016.1.198.000-06).

Clinical definitions used in this study can be found in the Supplementary Methods section (10). The participants' plasma or serum samples were frozen and stored in liquid nitrogen for up to 5 years or used for immediate measurement of glycated hemoglobin (HbA1c), blood glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL-C, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), and creatinine.

LabCorp conducted high-field 1H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (NMR LipoProfile, USA) to evaluate the size and plasma concentration of HDL subfractions. NMR-based lipoprotein profiling is a platform to investigate lipoprotein particle distributions because different lipoprotein fractions and subfractions have different magnetic susceptibilities that will broadcast various signals, with amplitudes reflecting particle concentrations (11). HDL particles were then separated according to their diameters, and all subspecies were analyzed.

CAC assessment was conducted using a 64-slice multidetector computed tomography (MDCT) scanner (Philips Brilliance, Amsterdam, Netherlands). The scanning procedure followed the standard method for scoring coronary artery calcium (CAC). The amount of CAC was measured using the Agatston method, which calculates the area and density product sum (2, 12, 13). CAC incidence was defined as having no CAC

detected on the initial exam (CAC = 0) but having detectable CAC on the follow-up exam (CAC > 0).

Baseline characteristics were examined using χ^2 , t , and Mann-Whitney tests. Stepwise forward logistic regressions were used to identify risk factors for CAC incidence. Normally and not normally distributed variables were reported respectively as mean $\pm$ SD and median (interquartile range [IQR]) (5). Net reclassification improvement (NRI) was used to assess the incremental predictive value of a novel biomarker for CACS incidence/progression beyond traditional risk factors. NRI quantifies the improvement in risk classification by comparing the proportion of individuals correctly reclassified into higher or lower risk categories based on adding the new biomarker. For this analysis, CAC progression was categorized into 3 risk groups: low (<5%), intermediate (5%-20%), and high (>20%). The Akaike information criterion (AIC) was used when performing a logistic regression (LR) to estimate the relative amount of information lost in the model. Analyses were conducted in R Studio (R-v.3.5.3).

Results

After a mean interscan period of 5.1 ± 0.9 years, a second CACS assessment was performed between 2016 and 2018. Among 2665 nondiabetic subjects at baseline, mean CACS value rose from 33.6 (95% CI, 0-164) to 44.5 (95% CI, 0-216) ($P = .010$), with an absolute risk of incident CACS of 20.7%. While among diabetic subjects, mean CACS rose from 106.4 (95% CI, 0-669) to 147.8 (95% CI, 0-802) ($P = .005$), with an absolute risk of incident CACS of 34.4% (Supplementary Table S1) (10).

When compared to nondiabetic subjects, T2DM was associated with increased risk of CAC incidence/progression with an unadjusted odds ratio (OR) of 2.01 (95% CI, 1.72-2.36; $P < .001$). This association in models adjusted for age, sex, systolic blood pressure, LDL-C, triglycerides, smoking, body mass index, creatinine clearance, and hsCRP showed an OR of 1.47 (95% CI, 1.23-1.76; $P < .001$). Each 5-year increase in diabetes duration was associated with an adjusted OR of 1.20 (95% CI, 1.05-1.39; $P < .01$) for incident CACS.

In the nondiabetic population, higher apolipoprotein B levels and smaller LDL particle size were associated with CAC progression (OR: 1.014; 95% CI, 1.003-1.025; $P = .012$ and OR: 0.796; 95% CI, 0.671-0.945; $P = .021$, respectively). These findings suggest that these lipoprotein characteristics may influence CAC in individuals without diabetes.

For the diabetic population, however, including these variables in the model did not substantially alter its predictive performance. The area under the curve (AUC) increased only slightly from 0.648 (95% CI, 0.5963-0.7002) to 0.666 (95% CI, 0.6149-0.7177), with no significant difference ($P = .1448$, DeLong's test). Likewise, since ethnicity is a recognized determinant of cardiovascular risk and CAC burden in various populations, we assessed its potential influence in our analysis. After incorporating ethnicity into the multivariate models, no significant changes were observed in the association between HDLp1 and CAC progression ($\beta = -.01267$, $P = .836$). The AUC of the models remained unchanged (AUC = 0.6860 vs 0.6861), and DeLong's test confirmed no significant difference between the models ($Z = -0.41711$, $P = .6766$). These findings suggest that, while ethnicity may contribute to CAC development in broader contexts, its inclusion in our models did not modify the primary conclusions of this study.

At the same time, statin use in the overall cohort ($n = 4331$) was associated with the HDL subfraction profile, with higher concentrations of HDLp1 (HDL 7-7.9 nm, $P < .001$) and HDLp2 (HDL 8-8.9 nm, $P < .001$), but lower concentrations of HDLp3-p7 (HDL ≥ 9 nm, $P < .001$) (7). Statin use showed an indication bias where individuals with a higher ASCVD risk profile had a higher likelihood of being prescribed a statin. Thus, for the following analyses, statin users ($n = 921$) were not included.

Considering only individuals with T2DM, non-statin users, and no history of ASCVD at baseline (Supplementary Table S2) (10), among the 461 individuals identified, a total of 143 (31.0%) patients had CAC incidence/progression. A higher proportion of men were in the first HDLp1 tertile compared to the third tertile (56% vs 27%, $P < .001$). Additionally, the third HDLp1 tertile also showed lower body mass index ($P = .002$), plasma levels of triglycerides ($P = .001$), and hsCRP ($P = .003$), but higher LDL-C ($P < .001$). Higher plasma levels of HDLp1 were associated with lower plasma levels of HDLp2 to HDLp7 (HDL ≥ 8 nm).

In an adjusted model for classic risk factors, the third tertile of HDLp1 was associated with a 55.2% (95% CI, 15%-110%; $P = .004$) and 140% (95% CI, 32%-341%; $P < .001$) increased risk for incident CAC compared to the middle (second) and lowest (first) tertiles, respectively (Supplementary Table S3) (10).

To assess whether HDL subfractions are associated with CAC progression in individuals without T2D, we conducted a secondary analysis. HDLp1 was not significantly associated with CAC progression ($\beta = -.01267$, $P = .836$), and its inclusion in the model did not improve predictive performance (AUC = 0.6860 vs 0.6861; $P = .6766$).

In contrast, age, male sex, systolic blood pressure, LDL-C, triglycerides, smoking, and HbA1c remained significantly associated with CAC progression (all $P < .05$). These findings suggest that, unlike in T2DM, HDLp1 is not meaningfully associated with CAC progression in nondiabetic individuals. Full results are available in the Supplementary Materials (Supplementary Table S4) (10).

This finding is consistent with the improvement in risk reclassification based on NRI (Table 1). Including HDLp1 led

to a 13.6% improvement in correct CAC incidence/progression classification compared to the baseline model (95% CI, 2.8%-18.8%; $P = .004$). Among individuals with incident CAC, 17% moved to higher-risk and 9.5% moved to lower-risk categories. Finally, a restricted cubic spline demonstrated a strong association between increasing plasma levels of HDLp1 and the risk of CAC incidence/progression (Fig. 1).

Discussion

Our study reveals a new model for predicting CAC incidence/progression among individuals with T2DM, which was significantly improved by adding a measure of small HDL particles (HDLp1) to traditional risk factors.

CAC scans are valuable for identifying risk, but our study suggests a high-risk subgroup missed by this method alone. In our study, adding HDLp1 testing correctly reclassified 13.6% of patients (14). This is particularly important because diabetic persons often develop CAC 10 years earlier than non-diabetic persons, highlighting the need for more precise risk assessment tools (3).

HDL particles' size features, identified by NMR, are significantly associated with cardiovascular disease (CVD) risk. HDLp1 is prebeta-1 discoidal HDL, initially low in cholesterol ester, modified by LCAT, and crucial for early cholesterol transport. It matures into spherical alpha-HDL with antioxidative and anti-inflammatory properties (15). Different HDL subfractions are associated with varying levels of CVD risk. Prebeta-1 HDL is vital for initial cholesterol efflux, while larger alpha-HDL particles are associated with lower CVD risk due to enhanced functions (16). Understanding HDL maturation may improve CVD risk management (17).

Our findings align with existing research. Under conditions of poor glycemic control, HDL functionality is notably impaired, generating a paradox. While the reduced size of HDLp1 favors the efficiency of reverse cholesterol transport, the metabolic dysfunction inherent to T2DM compromises HDL-driven cholesterol efflux capacity from macrophages (8, 18, 19). In subjects with diabetes, small HDL particles are enriched with proteins that regulate thrombosis and inflammation (and proportionally increased as compared to large HDL particles) (20, 21).

Our study has limitations. The exclusion of statin users might affect the generalizability of our results, as statins are a common therapeutic intervention for T2DM patients. However, the specific focus on statin-naïve individuals offers a unique perspective on the natural progression of CAC and provides a deeper understanding of the role of small HDL particles in atherogenesis among persons afflicted with T2DM. The analysis was adjusted for sex, and the distributions of HDL subfractions were examined separately. Indeed, the sample has a male predominance, which may limit the generalizability of the findings to women. Furthermore, individuals with T2DM exhibit a higher prevalence of small, dense HDL particles due to chronic hyperglycemia and oxidative stress, which may contribute to their increased cardiovascular risk independent of statin therapy. Although HDL glycation may be a critical factor, our database does not include direct measurements of glycated HDL. As an alternative, we used HbA1c as a proxy for glycemic status and observed that it was a factor associated with CAC.

Additionally, our findings are based on CAC progression as assessed by the Agatston score, which quantifies the total

Table 1. Net reclassification improvement for CAC incidence or progression, considering the low-risk threshold at 5% and high-risk threshold at 20%

	Estimate	Lower CI	Upper CI
NRI	0.13636	0.02379	0.18845
NRI+	0.07482	0.01492	0.12949
NRI-	0.06153	0.00887	0.09939
Probabilities for cases (CAC incidence or progression)			
Up-classification Cases)	0.17006	0.12080	0.22699
Down-classification Cases)	0.09523	0.07333	0.15492
Probabilities for controls			
Up-classification Controls)	0.16615	0.10638	0.17337
Down-classification Controls)	0.10461	0.06984	0.13375

Abbreviations: CAC, coronary artery calcium; NRI, net reclassification improvement.

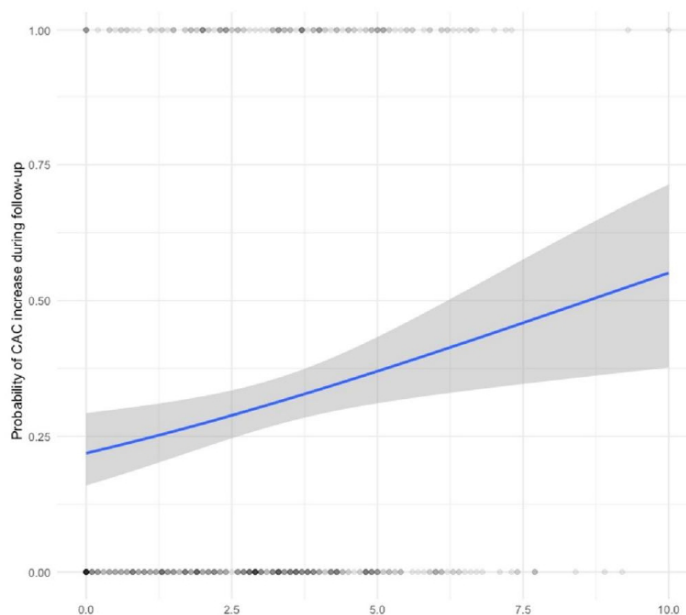


Figure 1. Restricted cubic spline showing the probability of incident CAC during a mean 5.1-year follow-up according to plasma levels of HDLp1 (HDL particles of diameter 7 to 8 nm) at baseline; global P value $< .001$ and P value for linearity $< .001$.

calcium burden. However, plaque density may also play a role in cardiovascular risk stratification. Future studies incorporating density-specific CAC measures could provide further insights into the differential role of HDL subfractions in atherosclerosis progression.

Conclusion

The clinical applicability of HDL subfraction quantification via NMR for cardiovascular risk assessment remains uncertain. While our findings suggest a potential association between HDL subfractions and CAC progression in individuals with T2D, these results should be interpreted cautiously. The clinical utility of measuring HDL particle size and concentration for routine risk stratification is yet to be validated in large-scale prospective studies. Further research is warranted to confirm these associations, elucidate potential mechanisms, and determine whether HDL subfraction analysis can provide additional prognostic value beyond traditional lipid markers.

In conclusion, our study demonstrates that the association between small HDL particles and CAC progression is significant in diabetic individuals not currently being treated with a statin and without a documented history of ASCVD. This high-risk subgroup could benefit from closer monitoring through follow-up CAC scans and consideration of statin therapy to help manage their cardiovascular risk.

Funding

The Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil) is supported by the Brazilian Ministry of Health (Department of Science and Technology [DECIT]), Ministry of Science, Technology and Innovation, the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq]) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). This study was funded by the Brazilian Ministry of Health (Department of Science and Technology [DECIT]) and the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (Financiadora de Estudos e Projetos [FINEP] and CNPq). Grant numbers: 01 06 0010.00 and 01.10.0643.03 (R.D.S.); 01 06 0212.00 and 01.10.0742-00 (B.A.); 01 06 0300.00 and 01.12.0284.00 (E.S.); 01 06 0278.00 and 01 10 0746 00 (M.G.); 01 06 0115.00 and 01.10.0773-00 (S.P.); and 01 06 0071.00 and 01.11-0093.01 (R.J.). L.S.F.C. is a recipient of grants: 310718/2021-0 from the CNPq, 371/2021, 585/2022 and 561/2023 from the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

Disclosures

The authors declare no conflicts of interest relevant to the subject matter or materials discussed in this manuscript. No author has received financial support, consulting fees, or other

benefits from any organization that could be perceived as influencing the content of this work.

Data Availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Due to ethical and privacy restrictions, individual participant data cannot be shared publicly. Aggregated data and statistical analysis scripts can be provided upon request for academic and research purposes.

References

- Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, *et al.* Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med.* 2008;358(13):1336-1345.
- Budoff MJ, Young R, Burke G, *et al.* Ten-year association of coronary artery calcium with atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) events: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Eur Heart J.* 2018;39(25):2401-2408.
- Ferret BS, Hunink MGM, Masharani U, Max W, Yeboah J, Fleischmann KE. Long-term predictions of incident coronary artery calcium to 85 years of age for asymptomatic individuals with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care [Internet].* 2021;44(7):1664-1671.
- Dzaye O, Dardari ZA, Cainzos-Achirica M, *et al.* Warranty period of a calcium score of zero: comprehensive analysis from MESA. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2021;14(5):990-1002.
- Grinberg T, Eisen A, Talmor-Barkan Y, *et al.* Novel plasma biomarkers of coronary artery calcium incidence or progression: insights from the prospective multi-ethnic Dallas heart study cohort. *Atherosclerosis [Internet].* 2024;390:117469.
- Rohatgi A, Khera A, Berry JD, *et al.* HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2014;371(25):2383-2393.
- Sokkoti S, Flores-Guerrero JL, Kieneker LM, *et al.* HDL particle subspecies and their association with incident type 2 diabetes: the PREVEND study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(6):1761-1772.
- Rosenson RS, Brewer HB, Ansell BJ, *et al.* Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol [Internet].* 2016;13(1):48-60.
- Aquino EML, Barreto SM, Bensenor IM, *et al.* Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-brasil): objectives and design. *Am J Epidemiol.* 2012;175(4):315-324.
- Teles BSBS, Ramalho SHR, Bittencourt MS, *et al.* Supplementary Material for Peer Review. *J Clin Endocrinol Metab.* 2025. Available in the online version of the article.
- Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Lab Med.* 2006;26(4):847-870.
- Greenland P, Blaha MJ, Budoff MJ, Erbel R, Watson KE. Coronary calcium score and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(4):434-447.
- Almeida-Pittito D, Ribeiro-Filho B, Barreto FF, *et al.* Circulating early biomarkers of atherogenesis in participants of the longitudinal study of adult health (ELSA-brasil) without diabetes or cardiovascular disease. *Arch Endocrinol Metab.* 2016;60(6):573-581.
- Kramer CK, Zinman B, Gross JL, *et al.* Coronary artery calcium score prediction of all cause mortality and cardiovascular events in people with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2013;346(mar25 1):f1654.
- Rosenson RS, Brewer HBJ, Chapman MJ, *et al.* HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem.* 2011;57(3):392-410.
- Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, *et al.* High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the framingham offspring study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(11):2181-2187.
- Rysz-Górzynska M, Banach M. Subfractions of high-density lipoprotein (HDL) and dysfunctional HDL in chronic kidney disease patients. *Arch Med Sci.* 2016;12(4):844-849.
- Du X-M, Kim M-J, Hou L, *et al.* HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export. *Circ Res.* 2015;116(7):1133-1142.
- Rosso LG, Lhomme M, Dellepiane A, *et al.* Poor glycemic control in type 2 diabetes enhances functional and compositional alterations of small, dense HDL3c. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2023;1862(2):2017-2019.
- Sacks FM, Liang L, Furtado JD, *et al.* Protein-defined subspecies of HDLs (high-density lipoproteins) and differential risk of coronary heart disease in 4 prospective studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(11):2714-2727.
- Cardner M, Yalcinkaya M, Goetze S, *et al.* Structure-function relationships of HDL in diabetes and coronary heart disease. *JCI Insight.* 2020;5(1):1-18.

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Documento de Aprovação/Isenção Ética



Sao Paulo, June 22, 2012.

/ hand(s)

Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo

Clinical Research Center of the University Hospital
UNIVERSITY OF SAO PAULO

REFERENT: Research Project "Longitudinal Study of Adult Health ELSA" - --
Responsible researcher: Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo - CEP- HU/USP Registration:
659/06-CAAE: 0016.1.198.000-06 - Sponsor: Study and Project Financing Agency - FINEP.

Dear Teacher

The Research Ethics Committee of the University Hospital of the University
of São Paulo, in a regular meeting held on June 22, 2012, analyzed and APPROVED the
documentation sent by you through the document received on June 1, 2012, as follows:

- Amendment to the protocol - Wave 2;
- Free and Informed Consent Form - Wave 2;
- ELSA Questionnaire - Wave 2.

We remind you that it is the researcher's responsibility to prepare and present to
this Committee annual reports (partial or final, depending on the duration of the research), in
accordance with Resolution No. 196/96 of the National Health Council, item IX.2, letter "c".

Yours sincerely,

Dr. Mauricio Seckler
Coordinator of the Research Ethics Committee at
the University Hospital of USP