

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Cinética plasmática de uma emulsão lipídica que se liga
aos receptores da LDL em pacientes com doença
arterial coronariana (DAC)**

Antonio Altair Magalhães Oliveira

**Tese para obtenção do grau de
Doutor**

**Orientador:
Prof. Titular
Raul Cavalcante Maranhão**

**SÃO PAULO
1999**

ANTONIO ALTAIR MAGALHÃES OLIVEIRA

Cinética plasmática de uma emulsão lipídica que se liga aos receptores da lipoproteína de baixa densidade - em pacientes com doença arterial coronariana

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Titular Raul Cavalcante Maranhão
(Orientador/Presidente)

Dr. Raul Dias dos Santos Filho
1 Examinador

Prof. Dr. Jayme Diament
2 Examinador

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
3 Examinador

Profa.Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla
4 Examinador

São Paulo, 05 de maio de 2.000

Aos meus pais

Althair e Heloisa

***Pelo sempre incentivo, dedicação e sacrifício,
para tornar em realidade um sonho.***

Ao Pedro e Alice

Com todo amor e carinho

A Lúcia Helena

Exemplo para todos.

Aos Mestres
Domênico e Falcone
pelas lições de vida e constante incentivo

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Raul C. Maranhão, pela oportunidade, orientação, amizade e paciência

Ao Dr. Raul Dias do Santos Filho, pelo auxílio na análise dos dados do presente trabalho e elaboração desta tese, pela amizade e pelo incentivo.

Ao Dr. Whady Armindo Hueb, pela valiosa colaboração na seleção e acompanhamento clínico dos pacientes.

À Dra. Carmen Vinagre, pela acolhida, constante orientação e amizade.

À Farmacêutica-Bioquímica, Maria da Conceição Moura Latrilha pelo auxílio e acompanhamento no desenvolvimento prático deste trabalho, pela amizade e incentivo.

Ao Renato Barboza, pelo valioso auxílio, pela amizade e apoio.

À Simone Ap. Corrêa, Mônica Z. dos Santos e todos demais amigos do Laboratório de Lípidos, do InCor-HCFMUSP

À amiga e colega Primavera Borelli, pelo apoio e incentivo durante todos estes anos.

À Lígia Gomes e Elvira Shinohara, pela amizade e apoio.

À todos os amigos e colegas da Disciplina de Hematologia Clínica e do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas-FCF/USP.

À todos os amigos e colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental-FCF/USP.

Aos pacientes do InCor-HCFMUSP, por acreditarem neste trabalho e no seu significado.

SUMÁRIO

Abreviações/Nomenclatura.....	2
Resumo.....	3
Abstract.....	6
Introdução.....	8
Justificativa.....	15
Objetivos.....	18
Casuística, Material e Métodos.....	20
Resultados.....	32
Discussão.....	41
Conclusões.....	48
Referências Bibliográficas.....	50

ABREVIACOES / NOMENCLATURA

apo A.....	apolipoproteína A1
apo E.....	apolipoproteína E.
apo B100.....	apolipoproteína B100
CE.....	colesterol éster
CL.....	colesterol livre
14C-OC.....	oleato de colesterol
CETP.....	proteína transferidora de colesterol éster
DAC.....	Doença Arterial Coronariana
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
3H-C.....	colesterol livre triciado
HCl.....	ácido clorídrico
HDL-C.....	colesterol de alta densidade
IDL-C.....	colesterol de densidade intermediária
IMC.....	índice de massa corpórea.
kDA.....	quilodalton
kBq.....	quilobequerel
KBr.....	brometo de potássio
LCAT.....	lecitina colesterol acil-transferase
LDL-C.....	colesterol de baixa densidade
LLP.....	lipase lipoprotéica
rpm.....	rotações por minuto
TG.....	triglicérides
TFR.....	taxa fracional de remoção
VLDL.....	colesterol de densidade muito baixa
v/v.....	volume a volume

RESUMO

A cinética plasmática de uma emulsão lipídica, que se liga aos receptores de LDL, foi estudada em 23 pacientes com Doença Arterial Coronariana (DAC) e em 16 indivíduos sadios (não apresentaram lesões obstrutivas, nem irregularidades, após serem submetidos à cineangiocoronariografia). Foram selecionados 39 participantes, sendo 30 do sexo masculino e 9 do sexo feminino, na faixa etária de 30 a 84 anos, com Índice de Massa Corpórea (IMC) entre 21 e 41 (kg/m^2), divididos em 2 grupos: DAC e Sadio. Após jejum de 12 horas, foram coletadas amostras de sangue total para determinação dos níveis séricos de lipídios e apolipoproteínas. A seguir foram injetadas, endovenosamente, emulsões com marcação radioativa, constituídas por lípidos puros (40 mg), trioleína (TG) 1 mg, oleato de colesterol (CE) 20 mg, colesterol (CL) 0,5 mg e os isótopos radioativos ^{14}C -oleato de colesterol e ^3H -colesterol. A cada participante foi administrado um volume da emulsão, correspondente à atividade de 37 kBq para o isótopo ^{14}C e de 74 kBq para o isótopo ^3H . Amostras de sangue foram colhidas nos intervalos 0,08, 1, 4, 10 e 24 h, após a aplicação da emulsão. O colesterol-éster e o colesterol livre foram isolados e tiveram suas radioatividades medidas em cintilador. As taxas fracionais de remoção do ^{14}C -oleato de colesterol e do ^3H -colesterol livre, foram estimadas por análise compartimental, com auxílio de um programa computacional. Observou-se que: - não há diferença entre os dois grupos, em relação à idade, porcentagem de indivíduos do sexo masculino e feminino e o IMC. Pacientes do grupo DAC apresentam níveis de HDL-colesterol ($p=0,0005$) e de apolipoproteína A1 ($p=0,009$), reduzidos em relação aos indivíduos do grupo Sadio. As taxas fracionais de remoção do ^{14}C -oleato de colesterol não diferiram entre os grupos DAC e Sadio ($0,107 \pm 0,026$ horas $^{-1}$ vs $0,064 \pm 0,009$ horas $^{-1}$, $p=\text{ns}$). A taxa fracional de remoção do ^3H -colesterol livre foi maior no grupo DAC do que no Sadio ($0,152 \pm 0,014$ horas $^{-1}$ vs $0,096 \pm 0,019$ horas $^{-1}$, $p=0,032$). A taxa fracional de remoção do ^3H -colesterol livre correlacionou-se diretamente com os níveis plasmáticos de triglicérides ($r=0,37$, $p=0,002$) e inversamente com os de HDL-C ($r=-0,47$, $p=0,002$) e LDL-C ($r=-0,35$, $p=0,03$). Não houve

diferenças significativas entre os perfís lipídicos e de apolipoproteínas dos pacientes do grupo DAC e os dos indivíduos do grupo Sadio.

ABSTRACT

The plasma kinetics of a lipidic emulsion that binds to LDL receptors was studied in patients with coronary artery disease (CAD) and in control subjects without CAD as documented by coronary angiography. CAD group consisted in 23 subjects (20 male and 3 of female sex, 37-70 year 21-37 body mass index), whereas the healthy control group had 16 subjects (10 male, 30-84 aged, 21-41 body mass index). The emulsion was prepared by ultrasonic irradiation of a lipid mixture in aqueous buffer and purified by a two-step ultracentrifugation procedure. The emulsion composition was lipids (40 mg), triglycerides (1 mg), cholesterol (0,5 mg), cholesterol oleate (20 mg) and was labeled with C^{14} and 3H . The emulsion was injected intravenously into the subjects after a 12 h fast and plasma samples were collected at 0.08, 1, 4, 10 and 24 hour time periods after the injection for determination of the plasma decaying curves of the radioactive lipids. With this purpose, the plasma samples were lipid extracted and the lipids were separated by thin-layer chromatography. Radioactivity was counted in a liquid scintillation solution. The plasma Fractional Clearance Rate (FCR, in h^{-1}) was estimated from the decaying curves by the method of minimum squares, with the aid of a computational software. The two study groups did not differ regarding age, sex, and BMI. The CAD group had smaller plasma HDL cholesterol and apolipoprotein (apo) A1 values, but LDL and VLDL cholesterol as well as apo B, were similar between the two groups. ^{14}C -cholesteryl ester FCR of the CAD group was not different from the controls (CAD: and Healthy: p). However, 3H -cholesterol FCR was greater in the CAD group than in the controls ($0,152 \pm 0,014 h^{-1}$ vs $0,096 \pm 0,019 h^{-1}$, $p=0,032$). 3H cholesterol FCR was positively correlated with triglyceride plasma concentration ($r=0,37$, $p=0,002$) and negatively correlated with HDL ($r=-0,47$, $p=0,002$) and LDL ($r=-0,35$, $p=0,03$). Therefore, the emulsion particles were similarly removed from the circulation in both CAD and healthy groups. Disturbances of cholesterol esterification and removal from the plasma of free-cholesterol are related with presence of CAD.

INTRODUÇÃO

As lipoproteínas são partículas esféricas, constituídas de diferentes lipídeos e proteínas (KOSTNER, 1983; REDGRAVE & MARANHÃO, 1985.). No centro dessas partículas concentram-se os lipídeos apolares, os ésteres de colesterol e os triglicérides. Na superfície encontram-se os fosfolipídeos, colesterol livre e proteínas (GOTTO *et al.*, 1986). Essas proteínas, as apolipoproteínas, facilitam a estruturação dos lipídeos, regulam a atividade enzimática sobre as lipoproteínas e mediam a captação das lipoproteínas pelos receptores celulares (MAHLEY *et al.* 1984; PACKARD *et al.* 1984). As lipoproteínas podem ser classificadas em cinco grandes classes, de acordo com sua densidade: os quilomícrons ($d < 0,095$ g/ml), as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL $0,95 < d < 1,006$ g/ml), as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL $1,006 < d < 1,019$ mg/dl), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL $1,019 < d < 1,063$ g/ml) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL $1,063 < d < 1,210$ g/ml) (BREWER *et al.* 1988; CHAPMAN *et al.* 1981; GOLDSTEIN *et al.* 1979; GOTTO *et al.* 1986).

A função das lipoproteínas é a de transportar os lipídios de origem exógena, ou seja, provenientes da dieta, ou endógena derivados da síntese, para os diversos tecidos do organismo. (KESANIEMI *et al.* 1983; PACKARD *et al.* 1984).

Os quilomícrons e as VLDL são lipoproteínas ricas em triglicérides, sintetizadas no intestino e fígado, respectivamente (GOTTO *et al.* 1986). Os remanescentes de VLDL (IDL) e as LDL, assim como os remanescentes de quilomícrons, são formados na circulação durante o catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicérides (BERGMAN *et al.* 1971; BILHEIMER *et al.* 1978; EISENBERG & LEVY 1975). As lipoproteínas de alta densidade (HDL) são sintetizadas no fígado (GOTTO *et al.* 1986; MATTHEWS 1957; PAUCIULLO *et al.* 1988), intestino (CHAPMAN 1986; GLICKMAN *et al.* 1978; GREEN *et al.* 1979) e provavelmente durante a lipólise de quilomícrons e VLDL (REDGRAVE & MARANHÃO 1985).

No homem, a regulação dos níveis plasmáticos do colesterol depende basicamente da síntese hepática das VLDL, que originam, através do seu catabolismo intravascular, as LDL, e da captação celular

das LDL por um sistema de receptores de alta especificidade, que removem essas partículas da circulação (BERMAN *et al.* 1978; BROWN & GOLDSTEIN 1986; HAVEL 1984; PACKARD *et al.* 1984).

Os lipídeos sintetizados no fígado são secretados para a circulação através de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Mais de 90% dos triglicérides presentes no sangue de indivíduos em jejum são transportados nessas lipoproteínas (EISENBERG & LEVY 1975; JANERO *et al.* 1984). Na circulação, as VLDL sofrem várias transformações. Nos capilares dos tecidos periféricos, interagem com a enzima lipase lipoproteica (LLP), ocorrendo hidrólise dos seus triglicérides. Os ácidos graxos liberados durante a hidrólise podem ser transportados pela albumina diretamente para o fígado, ou captados e utilizados como fonte energética pelos tecidos, ou ainda captados pelos adipócitos e estocados como triglicérides (FIELDING 1976; GOTTO *et al.* 1986; YANG *et al.* 1989).

No curso do processo de lipólise, as VLDL transferem para outras lipoproteínas, principalmente as HDL, o excesso de componentes de superfície, fosfolipídeos, colesterol livre e apolipoproteínas. A apo B100, por ser insolúvel em meio aquoso, não é dissociada da partícula durante a lipólise (BROWN *et al.* 1986; GOTTO *et al.* 1986). O colesterol livre transferido às HDL é esterificado na posição 3 pela enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), pela utilização do ácido graxo na posição 2 da fosfatidilcolina (DOBIASOVA *et al.* 1991; GLOMSET 1973). Os ésteres de colesterol são levados para o núcleo da HDL e transferidos de volta para as VLDL, processo mediado por uma proteína de transferência do éster de colesterol (BARTER *et al.* 1982). Simultaneamente, moléculas de triglicérides das VLDL são transferidas às HDL pela mesma proteína de transferência (BARTER *et al.* 1979; KOBAYASHY *et al.* 1979).

Dessa forma, as VLDL transformam-se em partículas menores, com maior densidade e menor tamanho, recebendo a denominação de remanescentes de VLDL ou lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) (BERMAN *et al.* 1978; BILHEIMIER *et al.* 1972; REDGRAVE & MARANHÃO 1985). Essas lipoproteínas, ricas em colesterol esterificado,

são reconhecidas na superfície das células hepáticas (JONES *et al.* 1984) e de outros tecidos, por duas classes de receptores: os receptores B/E e os receptores LRP. Estes últimos reconhecem a apolipoproteína E presente na superfície dos remanescentes, enquanto os receptores B/E reconhecem tanto a apolipoproteína E quanto a apolipoproteína B100. No homem, aproximadamente 50% dos remanescentes de VLDL são captados pelo fígado por endocitose mediada por receptores. Os outros 50% são transformados em LDL (REDGRAVE & MARANHÃO 1985).

As LDL são partículas globulares compostas por um núcleo de lipídeos apolares, principalmente ésteres de colesterol e uma quantidade residual de triglicérides, circundados por fosfolipídeos, colesterol livre e apolipoproteínas (B100 e E, aproximadamente 2,0%) (CHAPMAN 1986). Praticamente a única apolipoproteína da LDL é a apo B100 (98%) (CHAPMAN 1986; GOLDSTEIN & BROWN 1977). A apo B100 humana é uma glicoproteína constituída de 4.536 aminoácidos, totalizando 25 resíduos de cisteína (CLA DARAS *et al.* 1986; KNOTT *et al.* 1986), cuja sequência primária foi determinada por sequenciamento de DNA (CLADARAS *et al.* 1986). Seu peso molecular é de 513 kDa, havendo uma molécula de apo B100 por partícula de LDL. Essa apolipoproteína, insolúvel em meio aquoso, possui cinco domínios, sendo que o quarto domínio situado entre os resíduos dos aminoácidos 3070-4100 (KNOTT 1985), é a responsável pelo reconhecimento das LDL pelos receptores B/ E localizados na superfície das membranas celulares (BROWN & GOLDSTEIN 1983; GOTTO *et al.* 1986; MAHLEY & INNERARITY 1983). As LDL, partículas ricas em ésteres de colesterol, têm como função principal o transporte de colesterol para os tecidos periféricos, onde é utilizado na síntese de membranas, na formação de hormônios esteróides pelo córtex da supra-renal e pelas gônadas, além de outras funções (KOBAYASHI *et al.* 1979). Após interação com o receptor B/E, a partícula de LDL é interiorizada, sofrendo, a seguir, hidrólise lisossomal de seus componentes (GOLDSTEIN *et al.* 1979), enquanto que os receptores voltam para a superfície da célula, onde ficam disponíveis para nova ligação (BROWN *et al.* 1983; BROWN & GOLDSTEIN 1983).

GOLDSTEIN 1983). As moléculas de apolipoproteína B100 sofrem ataque de enzimas hidrolíticas, degradando-se em pequenos peptídeos e aminoácidos. Simultaneamente, o colesterol éster do núcleo da partícula sofre ação da lipase ácida, transformando-se em colesterol livre, com liberação de ácidos graxos (GOLDSTEIN & BROWN 1974). O aumento do colesterol livre intracelular ativa três mecanismos, que regulam sua concentração:

1 - Inibição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), e conseqüente inibição do colesterol;

2 - Aumento da atividade da enzima acil-Coenzima A-colesterol aciltransferase (ACAT), de forma a armazenar o excesso de colesterol na forma de ésteres de colesterol;

3 - Inibição da síntese de receptores de LDL, evitando entrada adicional de colesterol, protegendo a célula do excesso dessa substância (BROWN & GOLDSTEIN 1979; YANG *et al.* 1989).

Quando as partículas de LDL são captadas pelo fígado, o colesterol liberado por elas pode ser excretado pela bile, após oxidação a ácidos biliares, ou ser utilizado na biossíntese de lipoproteínas (MAHLEY & INNERARITY 1983).

A captação da LDL através de receptores inespecíficos acontece quando a partícula LDL sofre modificação na sua composição lipídica ou proteica (DAVIES 1986). Deste modo não ocorre regulação do metabolismo de colesterol, pois não há controle na atividade desses receptores. O acúmulo de lipídeos nos macrófagos pode provocar a transformação dos mesmos em células espumosas, semelhantes às encontradas nas lesões ateroscleróticas (BROWN & GOLDSTEIN 1983).

O mecanismo de captação é de grande importância no controle dos níveis de colesterol plasmático, pois altas concentrações desse lipídio na circulação sistêmica têm sido reconhecidas como um dos principais fatores de risco no desenvolvimento de doença aterosclerótica (GIANNINI 1989). Fatores constitucionais como idade, sexo, exercícios e alimentação rica em gorduras saturadas estão associados à elevação do colesterol sanguíneo.

A esterificação do colesterol no plasma é catalizada pela lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT), usando a apolipoproteína A1 (apo A1) como co-fator (GLOMSET 1968; DAVIES *et al.* 1982). Esta reação ocorre na superfície da lipoproteína e predominantemente na fração HDL, onde a maioria da apo A1 plasmática se encontra. O colesterol-éster recém-formado dirige-se da superfície para o interior da lipoproteína, de modo que o gradiente de incorporação da nova molécula de colesterol não esterificado é mantido (EISENBERG 1984; FIELDING & FIELDING 1995). O colesterol esterificado pode então ser eliminado através do catabolismo direto do HDL no fígado (via direta). Alternativamente, ele pode ser transferido para as lipoproteínas que contém apolipoproteína B100 (VLDL e LDL) pela proteína transferidora de colesterol-éster (CETP) e então removido como componente da LDL pelos receptores B/E (via indireta) (FIELDING & FIELDING 1995; FRANCESCHINI *et al.* 1991). Defeitos na esterificação plasmática do colesterol têm sido relacionados com hiperlipidemia (DOBIASOVA *et al.* 1991) e aterosclerose (RIFAI 1986). Entretanto, há controvérsias neste campo, tanto no excesso (DOBIASOVA *et al.* 1991) como na redução da esterificação (KUSIS *et al.* 1982; RIFAI 1986).

A avaliação da esterificação do colesterol plasmático pode ser feita por métodos *in vivo* e *in vitro*. As técnicas *in vitro* consistem nas determinações da atividade da LCAT, da taxa de esterificação do colesterol e da taxa fracional de esterificação da HDL. A atividade da LCAT é normalmente determinada, incubando-se plasma com um substrato (uma HDL análoga), marcada radioativamente com ^3H -colesterol livre. A taxa de esterificação do colesterol depende principalmente da quantidade de ^3H -colesterol livre como substrato para a LCAT. Níveis muito elevados de colesterol plasmático total e conseqüentemente colesterol livre, competirão pela LCAT com diminuição da taxa de esterificação. Os resultados obtidos são geralmente equivalentes à quantidade de LCAT presente no plasma. Entretanto, esse método pode superestimar a taxa molar real de esterificação no plasma.

A esterificação *in vivo* do colesterol plasmático tem sido avaliada através da injeção de ^3H -ácido mevalônico ou de ^3H -colesterol no plasma. Esses substratos podem ser injetados diretamente ou serem incorporados em lipoproteínas plasmáticas ou em lipossomas (YEN & NISHIDA 1990; KUDCHODKAR & SODHI,1976; BARTER, 1974). Essas técnicas se correlacionam com os valores de atividade de LCAT *in vitro*. O uso de emulsões ricas em colesterol , semelhantes à estrutura lipídica de lipoproteínas naturais, é uma alternativa para as técnicas de avaliação *in vivo*.

JUSTIFICATIVA

A necessidade da realização de estudos cinéticos abrangendo populações maiores foi destacada por Goldstein e Brown, em revisão de 1986 (BROWN & GOLDSTEIN 1986), onde os autores apontam ainda os obstáculos para atingir este objetivo. O risco de contrair doenças infecciosas como hepatite e AIDS, obriga à utilização de LDL autóloga. Isto, além do fato da obtenção e marcação radioativa da LDL plasmática ser um procedimento laborioso, limita em muito a capacidade de realização desses estudos. Além do mais, a composição da lipoproteína varia muito em um mesmo indivíduo, em função da variação da dieta. Os autores também apontam que a coleta de sangue, visando separar a LDL do plasma, tende a selecionar as partículas menos aptas a interagir com o receptor, enquanto as de maior afinidade apresentam maior probabilidade de ser removidas da circulação. Todas essas limitações conduzem à necessidade de se dispor de uma preparação padronizada e de fácil obtenção.

Uma solução para realizar estudos do metabolismo intravascular da LDL no ser humano de maneira prática e segura foi sugerida por Maranhão e cols (CESAR *et al.* 1987), a partir de observações sobre o comportamento em rato de uma microemulsão lipídica sem proteína e com estrutura parecida com a estrutura lipídica da LDL. Ao injetar a emulsão artificial marcada radioativamente na circulação sanguínea de ratos, verificaram que ela apresentava metabolismo que lembrava o das LDL. Essas emulsões adsorvem, em contato com as lipoproteínas do plasma, as apolipoproteínas solúveis, principalmente a apo E. A apo E funciona como meio ligante das partículas aos receptores celulares B/E (CESAR *et al.* 1987).

É importante frisar que a LDL natural liga-se ao receptor B/E através da apo B100. A apo B100, pelo seu tamanho e baixa solubilidade no meio aquoso, não se transfere das lipoproteínas naturais para a emulsão artificial. No entanto, em trabalho recente, a possível influência da apo B100 na remoção plasmática das partículas artificiais de LDL foi aquilatada (HIRATA *et al.* 1999). Ao adicionar apo B100 à emulsão, os autores verificaram que a remoção plasmática da emulsão ficava bem mais lenta. Este resultado confirmou as descrições da literatura, de

estudos de incubação com células , mostrando que a apo E tem mais afinidade pelo receptor B/E do que a apo B100. Portanto, a emulsão artificial tem mais afinidade pelo receptor da LDL do que a própria LDL natural (MARSH 1974).

Desta forma, no presente trabalho, utilizamos o modelo da emulsão artificial semelhante à LDL para estudar, em pacientes com Doença Arterial Coronariana (DAC) , o metabolismo intravascular das LDL.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi verificar se a cinética plasmática de uma emulsão semelhante à LDL, em pacientes com Doença Arterial Coronariana (DAC), é diferente da obtida em indivíduos sem Doença Arterial Coronariana (DAC), visando avaliar a existência de correlação entre a cinética dos componentes colesterol esterificado e colesterol livre da emulsão e a presença da doença.

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Os 39 participantes do experimento eram pacientes do Ambulatório do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sendo 30 do sexo masculino e 9 do sexo feminino, na faixa etária de 30 a 84 anos, com Índice de Massa Corpórea (IMC) entre 21 e 41 (Tabelas 1 e 2). Foram divididos em dois grupos de estudo:

Grupo DAC - 23 pacientes que, submetidos à cineangiocoronariografia, apresentaram 30 a 40 % de lesões obstrutivas em artérias coronárias (Tabela 1).

Grupo Sadio - 16 indivíduos que não apresentaram lesões obstrutivas, nem irregularidades, à cineangiocoronariografia (Tabela 2).

Os participantes dos dois grupos tinham faixa etária semelhante, conforme mostrado nas Tabelas 1 e 2. Os indivíduos não tinham outras patologias além de hiperlipidemias e diabetes (2 no grupo DAC), podendo ser obesos. Toda medicação anti-hipertensiva e de ação no sistema cardiovascular foi suspensa um dia antes e no decorrer dos experimentos. Os participantes foram previamente informados do procedimento e objetivo do estudo e assinaram termo de consentimento.

Este protocolo foi aprovado pelo Comitê Científico e pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Tabela 1. Características individuais dos pacientes do grupo DAC.

NÚMERO	SEXO	IDADE (ANOS)	IMC (KG/M ²)
50	M	61	27
51	M	54	26
52	M	60	27
53	M	37	24
54	M	63	26
55	F	70	26
56	M	61	28
57	M	62	25
58	M	51	-
59	M	63	24
60	M	42	28
61	M	46	30
62	M	59	25
63	F	58	21
64	M	60	34
65	M	61	-
66	M	63	23
67	M	61	33
68	M	49	26
69	M	39	21
70	F	38	21
71	M	46	37
72	M	67	27
Média	-	55	27
Erro Padrão	-	2,0	0,9

IMC- Índice de massa corpórea.

Tabela 2. Características individuais dos componentes do grupo Sadio.

NUMERO	SEXO	IDADE (ANOS)	IMC (KG/M ²)
01	F	62	41
02	F	36	27
03	F	45	34
04	M	48	26
05	M	30	30
06	M	61	22
07	M	50	24
08	F	53	26
09	F	59	26
10	M	52	26
11	M	84	25
12	F	65	26
13	M	38	21
14	M	58	37
15	M	54	32
16	M	59	23
Média	-	54	28
Erro Padrão	-	3,2	1,4

IMC- Índice de massa corpórea.

2. MATERIAL

Os isótopos radioativos [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-oleato de colesterol e ^3H -colesterol, utilizados na preparação das emulsões-LDL foram obtidos da Amersham International (Amersham, Reino Unido). Os lipídios puros, trioleína (TG), oleato de colesterol (CE) e colesterol (CL) utilizados na produção das emulsões, a partir de soluções-estoque, foram adquiridos na Nu-Chek Prep. (Elysian, EUA). A fosfatidilcolina foi obtida da Lipid Products (Surrey, Inglaterra). A técnica de Cromatografia em Camada Delgada (em placas de 0,5 mm de espessura), utilizando sílica-gel 60 H e sistema solvente de hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v) foi empregada para verificar a pureza dos lipídeos. Os demais reativos e solventes foram adquiridos da Merck-Quimitra (Rio de Janeiro, RJ), e da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA).

Toda a vidraria utilizada nesse experimento foi submetida à esterilização a seco (estufa a 180°C , por 1 h e 30 min.) e a vapor (autoclavagem a 120°C , por 20 min.). O material plástico e de borracha foi submetido à esterilização por exposição à luz ultravioleta por 12 h. Todo esse procedimento foi realizado pelo Setor de Esterilização do Instituto do Coração das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INCOR).

3. MÉTODOS

3.1. Preparação da Emulsão Marcada com [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-oleato de colesterol e ^3H -colesterol.

A emulsão foi preparada a partir da mistura de 40 mg de fosfatidilcolina (PL), 20 mg de colesterol oleato (CE), 1 mg de trioleína (TG), e 0,5 mg de colesterol livre (CL), dissolvidos em clorofórmio-etanol (2:1 v/v). Os lipídeos foram pipetados em frasco de vidro, onde adicionaram-se os isótopos [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-oleato de colesterol e ^3H -colesterol, correspondentes a uma atividade específica de 37 kBq/mg e 74 kBq/mg, respectivamente. A seguir, as misturas foram secas sob fluxo de

nitrogênio, em banho de água (37°C) e mantidas em dessecador a vácuo, por 16 h, a 4°C, para a remoção total dos solventes residuais. Ao final desse tempo, adicionou-se 10 ml de tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0, à mistura dessecada. A seguir, a suspensão de lipídeos foi emulsificada por irradiação ultrassônica durante 3 h, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 e 55°C, na qual os componentes estão em estado de transição cristal-líquido, controlada por termômetro digital inserido diretamente no frasco de vidro. A irradiação ultrassônica foi realizada com uma potência de 125 watts, em modo contínuo de operação por um disruptor de células Branson, mod. B 450 (Arruda Ultrassom, São Paulo, SP), equipado com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro.

Ao término da irradiação ultrassônica as emulsões foram purificadas por ultracentrifugação (Ultracentrífuga Sorvall, mod. OTD Combi. Rotor TH 641, Wilmington, USA), durante 30 min., a 35.000 rpm, e a 4°C. O sobrenadante da solução (1,0 ml) contendo partículas que flotavam em densidade de 1,006 g/ml, foi retirado e descartado. O volume restante foi submetido a nova ultracentrifugação a 35.000 rpm, durante 2 h, a 4°C, após adição de KBr sólido, para ajustar a densidade em 1,210 g/ml. Do sobrenadante foram removidos 2,0 ml, os quais continham a fração das partículas de tamanho e composição desejados.

A emulsão purificada foi dialisada utilizando-se 4,0 litros de tampão estéril TRIS- HCl 0,01 M, pH 8,0 e saco de diálise Spectrapor 6, que retém moléculas de proteína de peso molecular 12 Kdaltons (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, EUA), por 16 h, a 4°C, para a total remoção dos sais de KBr utilizados na etapa final de purificação. A seguir, a emulsão foi submetida à esterilização por filtração em filtros com poros de 0,2 micra de diâmetro (Millipore, São Paulo, SP).

3.2 Remoção Plasmática da Emulsão

3.2.1 Protocolo experimental

Após um jejum de 12 h, amostras de sangue total foram coletadas dos participantes, para a determinação dos lipídeos e apolipoproteínas plasmáticas. (Tabelas 3 e 4). As emulsões com

marcação radioativa foram então injetadas, por via endovenosa, nos indivíduos dos dois grupos de estudos, com a finalidade de estudar a cinética dos componentes radioisotópicos da emulsão. Em cada indivíduo foi administrado um volume de aproximadamente 0,2 a 0,6 ml, correspondente à atividade de 37 kBq para o isótopo ^{14}C e a de 74 kBq para o isótopo ^3H . Após a injeção, foram coletadas amostras de sangue (10,0 ml) nos intervalos de 0,08, 1, 4, 10 e 24 h.

Tabela 3. Características laboratoriais dos pacientes do grupo DAC
(lípidos em mg/dl e apolipoproteínas em g/l).

Número	Col. T	VLDL	LDL	HDL	TG	Apo-A1	Apo-B
50	229	27	179	26	136	1,09	1,41
51	252	75	140	27	373	1,74	1,52
52	266	64	170	32	320	1,66	1,81
53	188	36	146	33	179	1,51	1,35
54	173	25	115	33	126	2,30	1,87
55	230	50	132	30	252	2,14	1,75
56	297	49	218	30	245	2,05	1,81
57	315	77	201	37	385	2,22	1,75
58	348	48	252	48	238	2,14	1,69
59	270	31	202	37	154	1,81	1,63
60	217	*-	*-	24	**	1,51	1,25
61	229	61	136	32	306	1,41	1,15
62	239	58	154	27	290	1,09	1,20
63	294	37	217	40	184	1,59	1,52
64	275	34	211	30	168	1,51	1,58
65	216	52	139	25	260	1,30	1,41
66	199	42	126	31	212	1,59	1,36
67	158	22	126	30	111	1,30	1,25
68	209	48	132	29	240	1,41	1,41
69	216	28	155	33	142	1,51	1,36
70	205	23	129	53	116	2,14	1,52
71	186	27	131	28	133	1,97	1,46
72	209	16	138	55	78	2,14	1,52
Média	236	44	165	34	223	1,70	1,50
Erro Padrão	9,9	3,8	8,8	1,7	21	0,08	0,04

* valor não calculado ** soro lipêmico

Tabela 4. Características laboratoriais dos indivíduos do grupo Sadio.

(lípidos em mg/dl e apolipoproteínas em g/l).

Número	Col. T	VLDL	LDL	HDL	TG	Apo-A1	Apo-B
01	207	16	148	55	80	1,97	1,52
02	276	68	203	29	318	2,22	1,63
03	220	26	127	104	130	3,12	1,36
04	244	42	167	35	211	1,89	1,75
05	334	41	249	44	207	1,30	1,81
06	194	24	117	53	121	2,22	1,25
07	256	20	179	57	100	2,05	1,52
08	226	29	134	63	144	1,97	1,46
09	233	36	133	64	181	2,48	1,52
10	182	28	118	36	138	1,51	1,52
11	239	23	176	40	116	1,51	1,58
12	210	46	123	41	231	2,74	1,81
13	175	33	110	32	167	2,05	1,58
14	281	59	176	46	275	2,57	1,87
15	206	46	123	41	231	1,51	1,58
16	210	23	135	52	113	2,05	1,20
Média	230	35	151	50	171	2,07	1,56
Erro Padrão	9,9	3,5	9,2	4,4	17,0	0,12	0,05

3.2.2 Análise das Amostras do Plasma

As amostras de sangue (10,0 ml) colhidas em tubos de ensaio contendo heparina (50 UI/ml de sangue) como anticoagulante, foram centrifugadas por 10 minutos a 2.500 rpm. Em seguida, retirou-se 1,5 ml de plasma para proceder à extração de lipídeos em metanol:clorofórmio:água (12,5:25,0:12,5 v/v) por uma noite, a 4°C. A fase orgânica foi transferida para tubo de ensaio e seca sob fluxo de nitrogênio. Os lipídeos foram ressuspensos com 5 ml de solução de Folch (clorofórmio:metanol 2:1), e transferidos para tubos de ensaio. A seguir, foram secos sob fluxo de nitrogênio, ressuspensos com 300 microlitros de Folch e submetidos à separação por cromatografia em camada delgada (sílica-gel 60 H, 0,5 mm de espessura), com sistema solvente contendo hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v). As bandas correspondentes ao éster de colesterol e ao colesterol livre, após revelação em vapores de iodo metálico, foram separadas e transferidas para frascos de cintilação contendo 7,0 ml de solução de cintilação (PPO/Dimetil-POPOP/Triton X-100/Tolueno: 5,0 g/ 0,5 g/ 333 ml/ 667 ml) A radioatividade de cada fração foi medida em cintilador Beckman, modelo LS-100.

3.3 Análise das Amostras de Soro

As determinações bioquímicas de colesterol em amostras de soro obtidas do sangue coletado, antes de injeção da emulsão, foram realizadas pelos métodos de Siedel e cols. (SIEDEL *et al.* 1981) e Wahlefeld (WAHLEFELD 1985).

A dosagem do colesterol das HDL foi feita pelo mesmo método empregado para o colesterol total, após a precipitação da VLDL e LDL pelo método de Burnstein e cols.(BURSTEIN 1970).

A dosagem de triglicérides foi feita pelo método colorimétrico-enzimático.

A concentração de colesterol das VLDL e das LDL foi calculada pela aplicação da fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD 1972).

Os níveis plasmáticos de apolipoproteínas A1 e B foram determinados pelo método de imunodifusão radial simples, com as placas, Lipo-Partigen R-Apo A-I e Nor-Partigen R-Apo B da Hoescht-Behring (Rucil-Malmaison, França).

3.4 Tratamento dos dados

3.4.1 Cálculo da Taxa Fracional de Remoção

A taxa fracional de remoção (TRF) foi calculada com base no método dos mínimos quadrados, segundo a função:

$$y = a_1 \cdot e^{-(b_1 \cdot t)} + a_2 \cdot e^{-(b_2 \cdot t)}$$

onde y indica o decaimento do material radioativo em função do tempo (t); a indica o coeficiente linear e b , o coeficiente angular, o qual representa a taxa fracional de remoção (TRF), medida em horas⁻¹.

As taxas fracionais de remoção do ¹⁴C-oleato de colesterol e do ³H-colesterol livre foram estimadas a partir dos parâmetros a_1 , a_2 , b_1 e b_2 , segundo o método de Matthews (MATTHEWS 1957), pela aplicação da fórmula abaixo:

$$TFR = (a_1/b_1 + a_2/b_2)^{-1}$$

Os cálculos foram realizados com o auxílio de um programa computacional desenvolvido por Mesquita. (MESQUITA 1994)

3.4.2 Análise estatística

Os parâmetros clínicos (idade, índice de massa corpórea e sexo) e laboratoriais (colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglicérides, apo A1 e apo B) dos pacientes do grupo DAC e dos indivíduos do grupo Sadio, foram comparados pelo teste *t de Student* e pelo teste exato de Fisher.

A esterificação do ³H-colesterol livre foi avaliada de três maneiras:

- 1- Pela cinética plasmática do ³H-colesterol livre da emulsão, expressa pela taxa fracional de remoção, que corresponde à remoção da

partícula e à transformação do ^3H -colesterol livre em ^3H -colesterol esterificado.

- 2- Pela análise ponto a ponto (0,08 horas, 1 hora, 4 horas, 10 horas e 24 horas) do decaimento da radioatividade total do trício (radioatividade do ^3H -colesterol livre + radioatividade do ^3H -colesterol esterificado) expressa pela % em relação ao ponto 0,08 horas. Foi calculada também a taxa fracional de remoção total da radiação triciada.
- 3- Pelo cálculo da razão de esterificação ponto a ponto (0,08 horas, 1 hora, 4 horas, 10 horas e 24 horas) definida como : ^3H -colesterol livre / ^3H -colesterol livre esterificado.

A esterificação do colesterol nos pacientes do grupo DAC e nos indivíduos do grupo Sadio foi comparada pelo teste t de Student.

A cinética do ^{14}C -oleato de colesterol (taxa fracional de remoção), que corresponde à remoção da partícula de emulsão do plasma foi avaliada entre os grupos pelo teste t de Student.

A análise de correlação entre as taxas fracionais de remoção do ^3H -colesterol livre e do ^{14}C -oleato de colesterol e os parâmetros idade, colesterol total, LDL-C, HDL-C, VLDL-C, triglicérides e apolipoproteínas A1 e B, foi efetuada pelo teste de Spearman.

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. A significância estatística foi aceita com p bicaudal $< 0,05$.

RESULTADOS

Não houve diferença entre os indivíduos dos grupos DAC e Sadio com relação à idade ($55,0 \pm 2,0$ anos vs. $53,0 \pm 3,0$ anos), porcentagem de indivíduos do sexo masculino (87 % vs. 62,5 %) e índice de massa corpórea ($26,6 \pm 0,9$ kg/m² vs. $28,0 \pm 1,4$ kg/m²).

A taxa fracional de remoção do ³H-colesterol livre foi maior nos pacientes do grupo DAC do que nos do grupo Sadio ($0,152 \pm 0,014$ horas⁻¹ vs. $0,096 \pm 0,019$ horas⁻¹, $p = 0,032$). As curvas de decaimento plasmático dos lípides radioativos da emulsão encontram-se na Figura 1.

A somatória da radioatividade do trício (³H-colesterol livre + ³H-colesterol esterificado) foi similar nos tempos 0,08 horas, 1 hora e 4 horas, a partir da injeção da emulsão. Houve tendência à valores menores nos indivíduos do grupo DAC, após 10 horas da injeção da emulsão ($p = 0,077$) e houve diferença no tempo 24 horas ($p = 0,02$) (Tabela 5). As curvas de decaimento da soma ³H-colesterol livre + ³H-colesterol esterificado encontram-se na Figura 2.

A taxa fracional de remoção da soma da radioatividade do ³H-colesterol livre + ³H-colesterol esterificado, foi maior nos indivíduos do grupo DAC, do que nos do grupo Sadio ($0,031 \pm 0,022$ horas⁻¹ vs. $0,004 \pm 0,00085$ horas⁻¹, $p = 0,037$).

Na Tabela 6 encontram-se os dados da razão de esterificação dos pontos de 0,08 horas a 24 horas, nos dois grupos. Podemos ver que no grupo DAC, a razão é menor do que no grupo Sadio, nos tempos 10 horas ($p = 0,017$) e 24 horas ($p = 0,024$), não sendo diferente nos demais tempos.

Não houve diferença entre as taxas fracionais de remoção do ¹⁴C-oleato de colesterol entre os indivíduos do grupo DAC e os indivíduos do grupo Sadio ($0,107 \pm 0,026$ horas⁻¹ vs. $0,064 \pm 0,009$ horas⁻¹, $p = n.s.$). As curvas de decaimento encontram-se na Figura 3.

Os níveis de HDL-C ($p = 0,0005$) e apolipoproteína A1 ($p = 0,009$) (Tabela 7) do grupo DAC, foram menores do que os do grupo Sadio.

A taxa fracional de remoção do ³H-colesterol livre correlacionou-se diretamente com os níveis séricos de triglicérides ($r = 0,37$, $p = 0,002$);

houve correlação inversa com o LDL-C ($r = -0,35$, $p = 0,03$) e o HDL-C ($r = -0,47$, $p = 0,002$).

Não houve correlação da taxa fracional de remoção do ^3H -colesterol livre com os níveis plasmáticos das apolipoproteínas A1, B100, com o colesterol sérico e com a idade.

A taxa fracional da somatória da radioatividade ^3H -colesterol livre + ^3H -colesterol esterificado não se correlacionou com a taxa fracional de remoção do ^{14}C -colesterol ester nem com os níveis dos lipídes plasmáticos e apolipoproteínas A1 e B100.

A taxa fracional de remoção do ^{14}C -oleato de colesterol correlacionou-se apenas com a taxa fracional de remoção do ^3H -colesterol livre, ($r = 0,46$, $p = 0,0034$).

Não houve correlação da taxa fracional de remoção do ^{14}C -oleato de colesterol com o colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglicérides, apolipoproteínas A1 e B100 e com a idade.

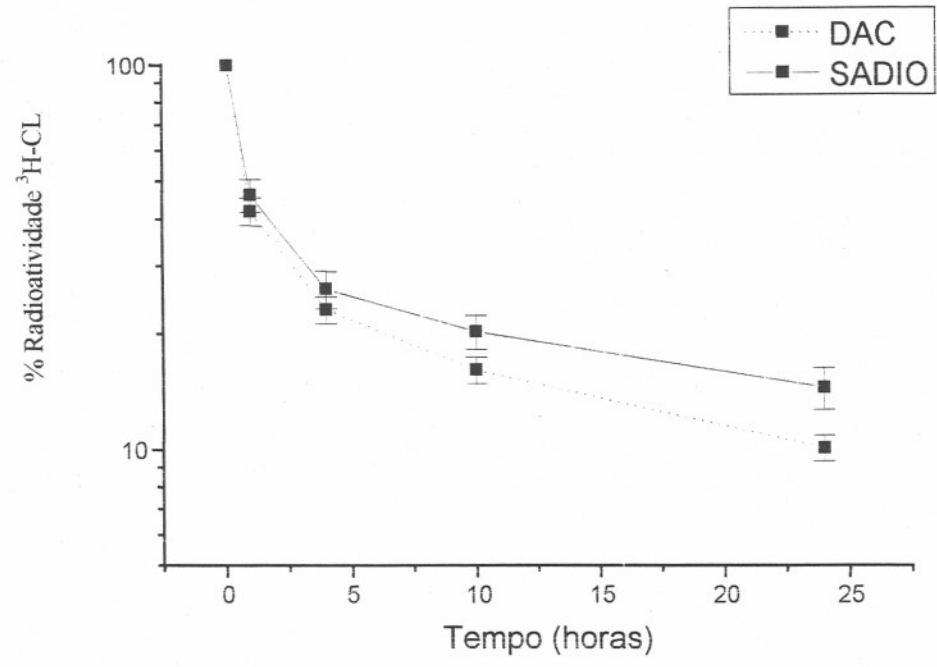


Figura 1: Curvas de decaimento plasmático do ³H-colesterol livre em pacientes do grupo DAC (n=23) e em indivíduos do grupo Sadio (n=16).

Tabela 5: Somatória % da radioatividade do trício ($^3\text{HCL} + ^3\text{H-CE}$) nos grupos DAC e Sadio, de 0,08 a 24 horas após a injeção da emulsão.

Tempo(h)	DAC	Sadio	P
0,08	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	n.s
1	52,0 \pm 4,5	56,0 \pm 6,0	n.s
4	36,0 \pm 4,0	40,0 \pm 4,5	n.s.
10	21,0 \pm 2,0	27,0 \pm 3,0	0,077
24	13,0 \pm 1,0	19,0 \pm 2,5	0,02

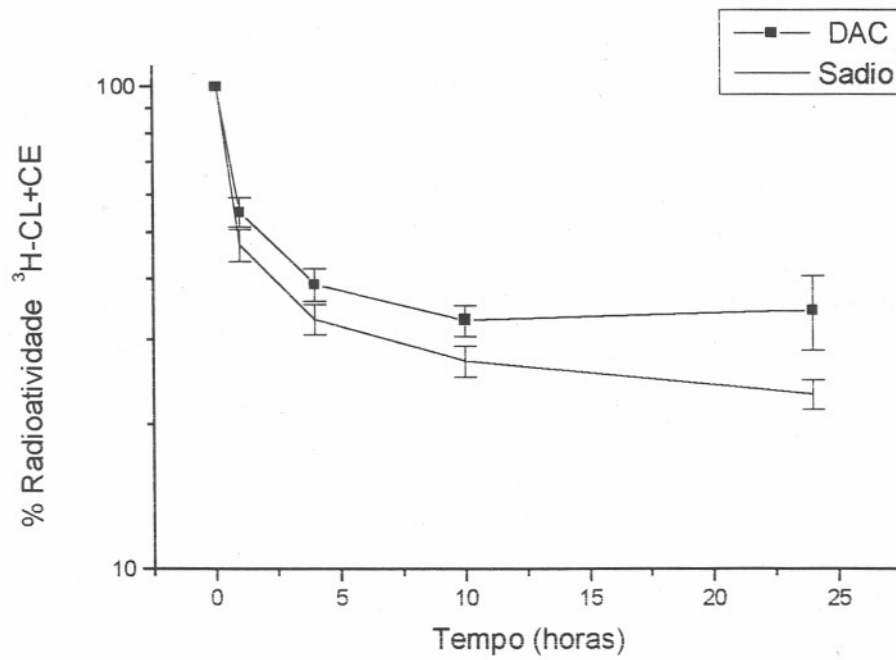


Figura 2: Curvas de decaimento plasmático do ^3H -colesterol livre + ^3H -colesterol ester em pacientes do grupo DAC (n=23) e em indivíduos do grupo Sadio (n=16).

Tabela 6 : Razão de esterificação ($^3\text{H-CL} / ^3\text{H-CE}$) nos grupos DAC e Sadio.

Tempo(h)	DAC	Sadio	P
0,08	$2,4 \pm 0,016$	$2,7 \pm 0,35$	n.s
1	$1,9 \pm 0,10$	$2,0 \pm 0,14$	n.s
4	$1,50 \pm 0,06$	$1,64 \pm 0,08$	n.s.
10	$1,24 \pm 0,025$	$1,38 \pm 0,05$	0,017
24	$1,14 \pm 0,01$	$1,20 \pm 0,03$	0,024

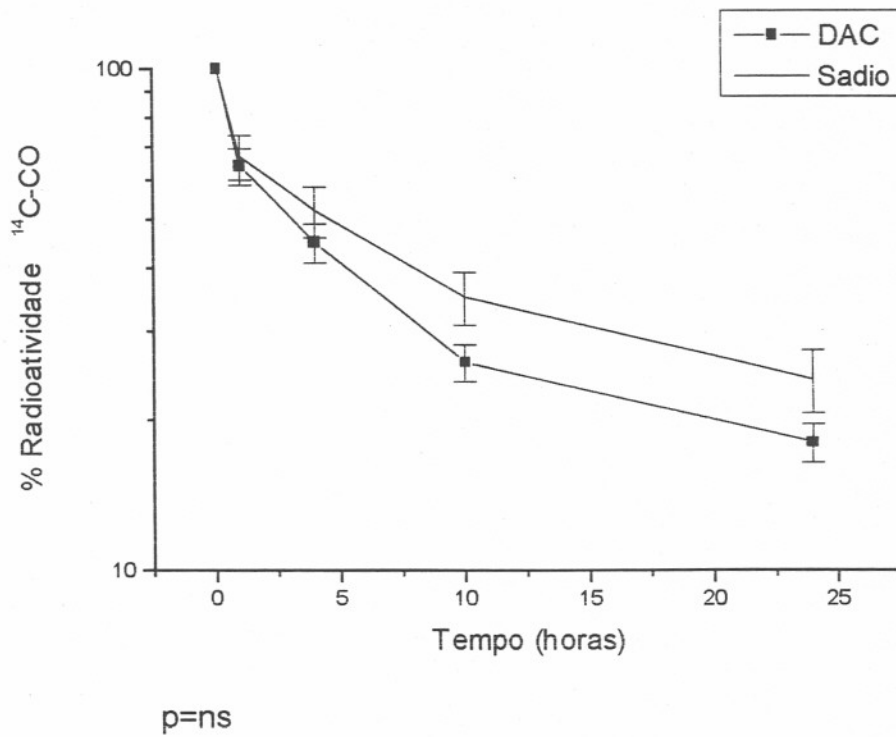


Figura 3 : Curvas de decaimento plasmático de ^{14}C -oleato de colesterol em pacientes do grupo DAC (n=23) e nos indivíduos do grupo Sadio (n=16).

Tabela 7 : Lipídes (mg/dL) e apolipoproteínas séricos (g/L) dos grupos DAC e Sadio.

	DAC	Sadio	P
Colesterol total	236,0 ± 10,0	231,0 ± 10,0	n.s
LDL-C	165,0 ± 9,0	151,0 ± 9,0	n.s
HDL-C	34,0 ± 2,0	50,0 ± 4,0	0,0005
VLDL-C	44,0 ± 4,0	35,0 ± 3,5	n.s.
TG	223,0 ± 21,0	171,0 ± 17,0	n.s
Apo A1	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,009
Apo B	1,5 ± 0,04	1,6 ± 0,05	n.s.

DISCUSSÃO

O *status* da LDL na circulação é usualmente avaliado medindo-se a concentração plasmática dos componentes da lipoproteína, tais como o colesterol da LDL e a apo B100 (principal proteína da LDL), após jejum de 12 horas. Em estudos epidemiológicos têm sido sistematicamente estabelecida a correlação direta entre os níveis de colesterol de LDL ou apo B100 e a incidência de DAC. No entanto, é desejável, além das medidas estatísticas de concentração plasmática, o conhecimento da cinética plasmática da lipoproteína. As medidas cinéticas são dificultadas pelo fato da obrigatoriedade da injeção da LDL autóloga, com as limitações operacionais que já mencionamos e que tornam os estudos de cinética plasmática limitados a poucos indivíduos. A introdução do método das emulsões artificiais semelhantes à LDL contorna essas dificuldades, pois com uma única preparação, realizada por metodologia prática e rápida, é possível estudar um grande número de indivíduos. Além do mais, a LDL natural constitui-se em fração heterogênea. Sua composição apresenta diferenças de indivíduo para indivíduo, o que resulta em considerável variação nos dados cinéticos. Pelo contrário, a emulsão artificial é uma preparação padrão onde essas variações composicionais são bastante reduzidas, uniformizando os resultados. A preparação artificial tem depuração plasmática muito maior do que a LDL natural, devido ao fato de a apo E, através da qual as partículas artificiais se ligam ao receptor da LDL, ter afinidade maior pelo receptor, do que a apo B100 que liga a LDL natural. Isto traz uma vantagem adicional, já que reduz o tempo de permanência do paciente no laboratório. No entanto, o fato da partícula ser obtida artificialmente e não conter a apo B100 presente na LDL constitui-se, intrinsecamente em limitação metodológica, exigindo cuidado na interpretação e extrapolação dos dados para o circuito metabólico da LDL natural. A utilidade da emulsão para testar o metabolismo da LDL ficou patente em estudo anterior do nosso grupo, onde se mostrou que a emulsão é removida do plasma mais lentamente em pacientes com hipercolesterolemia familiar do que no grupo controle de indivíduos normolipidêmicos (MARANHÃO *et al*, 1997). Isto é exatamente o esperado quando se considera, na hipercolesterolemia, o comportamento no plasma da LDL natural. A experiência mostra, portanto

a adequação da emulsão artificial para se estudar o metabolismo da LDL natural.

A concentração aumentada da LDL no plasma é um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de DAC. O aumento dos níveis plasmáticos de LDL, teoricamente, pode se dever tanto a aumento da síntese hepática da lipoproteína precursora, a VLDL, quanto à diminuição da remoção plasmática da própria LDL, processo que, como já vimos é feito pelos receptores B/E. O segundo mecanismo, ou seja, a diminuição da saída da LDL do compartimento plasmático é o responsável pela hipercolesterolemia familiar. Aliás, de uma maneira geral, a diminuição da remoção plasmática está envolvida na maioria das situações em que há tendência a aumento dos níveis de LDL e colesterol plasmáticos. Por exemplo, no caso de indivíduos em uso de dietas ricas em gordura saturada, essas gorduras tendem a diminuir a expressão dos receptores B/E (GRUNDY e DENKE, 1997), desta forma diminuindo a remoção da LDL.

No presente trabalho, especulamos com a possibilidade de que, independentemente do nível plasmático da LDL, pudesse haver diferenças nas taxas de remoção da lipoproteína que estivessem relacionadas com a presença de DAC. Exemplificando, dois grupos de indivíduos podem ter concentração plasmática de LDL semelhantes, mas em um deles ocorre maior remoção plasmática da lipoproteína, compensada por maior síntese de LDL (a partir de maior síntese pelo fígado da lipoproteína precursora, a VLDL e maior conversão desta no seu produto catabólico final, a LDL). Desta forma, em dois grupos com concentração de LDL semelhante, um deles teria maior *turnover* da lipoproteína (maior síntese hepática e maior remoção) do que o outro, que teria menor síntese (menor entrada no compartimento plasmático), compensada por menor remoção plasmática (menor saída do compartimento). Neste caso o grupo com maior *turnover* teria no compartimento plasmático um *pool* de LDL com menor tempo de residência, ou seja, lipoproteínas mais "renovadas". Um *pool* de LDL nestas condições, por exemplo, estaria menos propenso a sofrer processos de transformação como os de peroxidação lipídica e proteica,

associados com a aterogênese. Esta hipótese não foi, em última análise, confirmada pelos nossos resultados, já que a TFR do éster de colesterol da emulsão não foi diferente entre o grupo de indivíduos com DAC e o grupo sadio. O éster de colesterol é o marcador mais fidedigno da remoção das partículas da emulsão, já que o colesterol livre pode se difundir facilmente no plasma, enquanto o éster de colesterol depende de proteínas de transferência para sair das partículas da emulsão.

No tocante à avaliação da esterificação do colesterol livre da emulsão, foi encontrada diferença entre os grupos DAC e Sadio. Os dados sugerem que o colesterol livre da emulsão pode estar sendo removido da circulação mais rapidamente nos portadores de DAC. A remoção do colesterol livre do compartimento plasmático ocorreria por vários mecanismos:

- a) Remoção do colesterol livre em conjunto com a emulsão que vai sendo retirada do plasma;
- b) Transferência para as frações de lipoproteínas plasmáticas, sendo retirado da circulação em conjunto com elas;
- c) O colesterol livre é esterificado, sendo removido em conjunto com as partículas da emulsão;
- d) O colesterol livre é esterificado e transferido para as frações de lipoproteínas plasmáticas sendo removido da circulação em conjunto com elas. O colesterol livre pode também transferir-se para as lipoproteínas plasmáticas e ser esterificado enquanto nelas, sendo removido subsequentemente em conjunto com as lipoproteínas;
- e) Esterificação e posterior remoção com a emulsão ou integrado às lipoproteínas plasmáticas para as quais se havia transferido e
- f) O colesterol livre sai da emulsão, precipitando-se na parede arterial.

Aparentemente, a maior TFR do colesterol livre dos indivíduos do grupo DAC deve refletir uma maior esterificação, já que não houve diferença na remoção das partículas da emulsão, representada por valores similares da TFR do ^{14}C -oleato de colesterol entre os grupos.

Os ésteres de colesterol são um componente importante da placa de ateroma (PAUCIULLO *et al*, 1988). O excesso de esterificação plasmática, como encontrado em nosso estudo, poderia predispor à aterosclerose já que as lipoproteínas estariam proporcionalmente mais ricas em ésteres de colesterol. Uma LDL rica em ésteres de colesterol, carregaria uma concentração maior desses lipídios para a parede da artéria . A LDL modificada por processo de oxidação seria captada pelos macrófagos gerando células espumosas que são as precursoras da placa de ateroma (STEINBERG *et al*, 1989).

O aumento da esterificação do colesterol livre encontrado em nosso estudo poderia representar um fator predisponente isolado para aterosclerose ou ser secundário a um conjunto maior de alterações do metabolismo lipídico que predisponham a essa doença. De fato, a esterificação do colesterol livre expressa como TFR do ³H-colesterol livre apresentou correlação com as concentrações dos lipídeos plasmáticos. Quanto maiores as concentrações dos triglicérides maior a esterificação. Por outro lado, quanto menores os valores do HDL-C e LDL-C maior a esterificação. Existe evidência de que os níveis plasmáticos de triglicérides sejam um fator importante na esterificação do colesterol (MURAKAMI *et al*, 1995). Murakami *et al*. encontraram em modelo *in vitro*, que o plasma de indivíduos hipertrigliceridêmicos apresentava taxas fracionais de esterificação do colesterol superiores às encontradas no plasma de normolipidêmicos e de hipercolesterolêmicos. Da mesma maneira que em nosso estudo com emulsões artificiais, a taxa de esterificação correlacionou-se diretamente com os triglicérides e de maneira inversa com o HDL-C . Esses autores acreditam que níveis elevados de triglicérides poderiam aumentar a esterificação, por aumentarem a concentração de partículas de HDL3 em detrimento da HDL2. A HDL3 apresenta uma maior interação com a LCAT do que a HDL2 (BARTER *et al*. 1984; WALD *et al* 1990; McCALL *et al*. 1993). Outro fato importante seria o aumento da transferência do colesterol esterificado na HDL para a LDL e VLDL por ação da CETP, o que é diretamente proporcional aos níveis de triglicérides. Ou seja, haveria uma

menor inibição de produto sobre a LCAT que então esterificaria mais o colesterol (FIELDING & FIELDING, 1981).

É fato bem estabelecido que os níveis do HDL-C apresentam correlação inversa com os níveis de triglicérides do plasma (MILLER, 1998). Este fato ocorre por intermédio da CETP que troca moléculas de triglicérides por moléculas de colesterol éster (FRANCESCHINI *et al.* 1991; FIELDING & FIELDING, 1995). A correlação inversa da esterificação com os níveis plasmáticos de HDL-C encontradas em nosso estudo e no estudo de Murakami (MURAKAMI *et al.* 1995) provavelmente é secundária a esse fenômeno. Dessa maneira, níveis elevados de triglicérides poderiam predispor à aterogênese, por aumentar a esterificação do colesterol livre, além das bem demonstradas alterações no metabolismo lipídico como redução do HDL-C, hiperlipidemia pós-prandial (WEINTRAUB *et al.*, 1987), aumento da densidade e oxidabilidade da LDL (AUSTIN *et al.*, 1988; CHAPMAN *et al.*, 1988) e alterações da coagulação (GRUNDY, 1997).

Em nosso estudo os pacientes do grupo DAC apresentaram níveis plasmáticos de HDL-C mais baixos do que os indivíduos do grupo Sadio, apesar dos níveis plasmáticos de LDL-C, em ambos os grupos, serem similares. Embora não tenha havido diferença estatística, podemos notar também uma tendência à níveis plasmáticos mais altos dos triglicérides no grupo DAC. Dessa forma acreditamos, baseando-se nas análises de correlação realizadas, que os pacientes do grupo DAC tenham maior esterificação devido ao seu perfil lipídico alterado, quando comparados aos indivíduos do grupo Sadio.

Uma possibilidade que pode ser levantada dos nossos resultados refere-se ao achado de maior remoção de colesterol livre nos pacientes do grupo DAC, quando comparados aos seus controles sadios. Pode-se especular que, no caso dos pacientes do grupo DAC, o colesterol livre, que difunde-se com facilidade para as partículas da emulsão, tenha tendido a aderir à superfície do ateroma, o que explicaria sua maior saída do compartimento plasmático. Pelas suas implicações nos mecanismos da aterogênese, onde o depósito de colesterol é etapa fundamental, essa hipótese pode merecer enfoque em pesquisas subsequentes, visando

verificar se este fenômeno possa ocorrer realmente nos processos de formação e desenvolvimento do ateroma.

CONCLUSÕES

- 1- A remoção da emulsão lipídica semelhante a LDL, expressa pela TFR ^{14}C - oleato de colesterol não diferiu entre os grupos, sugerindo que os pacientes do grupo DAC não tenham alterações na remoção plasmática das partículas da emulsão.

- 2- A esterificação do ^3H -colesterol livre da emulsão lipídica , semelhante à LDL, foi maior em pacientes do grupo DAC, quando comparada à dos indivíduos do grupo Sadio, sugerindo que os pacientes do grupo DAC tenham alterações no processo de esterificação do colesterol ou tendência a remover este componente com maior intensidade do que os indivíduos do grupo Sadio.

- 3- A TFR do ^3H -colesterol livre correlacionou-se diretamente com os níveis plasmáticos de triglicérides e inversamente com os níveis plasmáticos de HDL-C e LDL-C, sugerindo que haja interrelações metabólicas entre a emulsão e essas frações lipoproteicas .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

16.229

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

- AUSTIN M. A., BRESLOW J. L., HENNEKENS C. H., BURING J. E., WILLETT W. C., KRAUSS R. M. . Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. **JAMA**, Chicago, v. 260, p. 1917-1921, 1988.
- BARTER, P. J. Production of plasma esterified cholesterol in lean normotriglyceridemic humans. **J.Lipid Res.**, New York, v.15, p.234-242,1974
- BARTER, P.J.; GOODEN, J.M.; RAJARAM, O .V. Species differences in the activity of a serum triglyceride transferring factor. **Atherosclerosis**, Shannon, v.33, p.165-169, 1979.
- BARTER, P.J.; HOPKINS, G.J.; CALVERT, G.D. Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. **Biochem.J.**, London, v. 208, p.1-7, 1982.
- BARTER, P.J.; HOPKINS, G.J.; GORJATSCHKO, L.; JONES, M.E. Competitive inhibition of cholesterol esterification by human high-density lipoprotein-subfraction. **Biochim. Biophys. Acta**. Amsterdam, v.793, p. 260-268, 1984.
- BERGMAN, E.N.; HAVEL, R.J.; WOLFE, B.M.; OHMER, T. Quantitative studies of metabolism of chylomicron triglycerides and cholesterol by liver and extra- hepatic tissues of sheep and dogs. **J.Clin.Invest.**, New York, v. 50, p.1831-1839, 1971.
- BERMAN, M.; HALL, I.M.; LEVY, R.I.; EISENBERG, S.; BILHEIMER, D.W.; PHAIR, R.D.; GOEBEL, R.H. Metabolism of apo B and apo C lipoproteins in man: kinetic studies in normal and hyperlipoproteinemic subjects. **J.Lipid. Res.**, New York, v.19, p.38-56, 1978.

BILHEIMER, D.W.; EISENBERG, S.; LEVY, R.I. The metabolism of very low density lipoprotein proteins. I. Preliminary in vitro and in vivo observations. **Biochim.Biophys.Acta**, Amsterdam, v. 260, p. 212-221, 1972.

BREWER Jr., HB.; GREGG, R.E.; HOEG, J.M.; FOJO, S.S. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: an overview. **Clin.Chem.**, Wiston-Salem, v. 34(B), p. 4-8, 1988.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Receptor - mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system. **Proc.Natl.Acad.Sci.**, Washington, v. 76, p. 3330-3337, 1979.

BROWN, M.S.; KOVANEN, P.T.; GOLDSTEIN, J.L. - Regulation of plasma holesterol by lipoprotein receptors. **Science**, Washington, v.212, p. 628-635, 1981.

BROWN, M.S.; ANDERSON, R.G.W.; GOLDSTEIN, J.L. Recycling receptors: the round trip itinerary of migrant membrane proteins. **Cell**, Cambridge, v. 32. p.663-667, 1983.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Ann.Rev.Biochem.**, Palo Alto, v.52, p. 223-2261, 1983.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. - Lipoprotein receptors in the liver. **J.Clin.Invest.**, New York, v. 72, p. 743-747, 1983.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. - A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, Washington, v. 232, p.34-47, 1986.

- BURSTEIN, M.; SCOLNICK, H.R.; MORFIN, R. - Rapid methods for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **J.Lipid.Res.**, New York, v.11, p.583-595, 1970.
- CESAR, T.B.; PEDROSO, S.R.; HIRATA, M.H.; QUINTÃO, E.C.R., MARANHÃO, R.C. Metabolic behavior of protein-free microemulsion of fosphatidyl-choline and cholesteryl oleate in the rat. **Arch.Biol.Technol.**, Caxambú, v. 30, p.13, 1987.
- CHAPMAN, M.J.; GOLDSTEIN, S.; LAGRANGE, D. - A density gradient ultra-centrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes for human serum. **J.Lipid.Res.**, New York, v.22, p. 339-358, 1981.
- CHAPMAN, M.J. - Comparative analyses of mammalian plasma lipoproteins. **Meth.enzymol.**, New York, v. 128 (A), p. 70-143, 1986..
- CHAPMAN M. J., LAPLAUD P. M., LUC G, ET AL. Further resolution of low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physiochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation. **J. Lipid. Res.**, New York, v. 29, p. 442-458, 1988.
- CLADARAS, C; HADZOPOULOU-CLADARAS, M; NOLTE, R.T.; ATKINSON, D.; ZANNIS, V.I. - The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apo B-100 and apo B-48 forms. **EMBO J.**, v. 5, p. 3495-3507, 1986.
- DAVIES, R.A.; HELGERUND P.; DUELAND S.; DREVON CA. Evidence that reverse cholesterol transport occurs in vivo and requires lecithin: cholesterol acyl-transferase. **Biochim. Biophys Acta**, v. 689, p. 410-414, 1982
- DOBIASOVA, M.; STRIBRNA, J.; SPARKS, D.L.; PRITCHARD, P.H.; FROLICH, J.J. Cholesterol esterification rates in very low density

lipoprotein-and low density lipoprotein-depleted plasma.
Arterioscler. Thromb, v.11, p.64-70, 1991.

EISENBERG, S.; LEVY, R.I. Lipoprotein metabolism. **Adv.Lipid.Res.**,
New York, 13, p.1-89. 1975.

EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism **J.Lipid.Res.**, New
York, 24, p. 1017-1058, 1984.

FIELDING, C.J. Lipoprotein lipase:Evidence for high and low affinity
enzyme sites.**Biochemistry**, Washington, v. 15, p. 879-884, 1976.

FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E..Regulation of human plasma lecithin:
cholesterol acyltransferase activity by lipoprotein acceptor
cholesterol ester content.**J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.256, p.2102-
2104, 1981.

FIELDING C. J. ; FIELDING P. E. Molecular physiology of reverse
cholesterol transport. **J. Lipid Res**. New York, v. 36, p.211-228,
1995.

FRANCESCHINI, G. ; MADERMA, P.; SIRTORI, C. R. Reverse
cholesterol transport: physiology and pharmacology.
Atherosclerosis, Shannon,v.88, p. 88-107, 1991..

FRIEDEWALD, W.T. Estimation of the concentration of low density
lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative
ultracentrifuge. **Clin.Chem.**, Winston-Salem, v. 18, p. 499-505, 1972.

GIANNINI, S.D. Doença coronariana aterosclerótica e colesterol.
Rev.Bras.Med., São Paulo, v. 26, p. 31-8, 1989.

GINSBURG, G.S.; SMALL, D.M.; ATKINSON, D. Microemulsions of
phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low
density lipoprotein. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, v. 257, p. 8216-8227,
1982.

- GLICKMAN, R.M.; GREEN, P.H.; LEES, R.S.; TALL, A.R. Apolipoprotein A-I synthesis in normal intestinal mucosa and in Tangier disease. **N.Eng.J.Med.**, Boston, v. 299, p.1424-1427, 1978.
- GLOMSET, J.A. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. **J. Lipid Res.** New York, v.9, p.155-167, 1968.
- GLOMSET, J.A.; NORUM, K.R. - The metabolic role of lecithin cholesterol acyl- transferase: perspectives from pathology. **Adv.Lip.Res.**, New York, v. 11, p.1-65, 1973.
- GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. **J.Biol.Chem.**, Baltimore, v. 249, p.513-562; 1974
- GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Atherosclerosis: the low density lipoprotein receptor hypothesis. **Metabolism**, New York, v. 26, p. 1257-1275, 1977.
- GOLDSTEIN, J.L.; ANDERSON, D.W.; BROWN, M.S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. **Nature**, London, v. 279, p. 679-685, 1979.
- GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. The LDL receptor locus and genetics of familial hypercholesterolemia. **Ann.Rev.Genet.**, v. 13, p. 259, 1979.
- GOTTO Jr, A.M. High density lipoproteins: Biochemical and metabolic factors. **Am. J.Cardiol.**, New York, v. 52, p. 2-4, 1983.
- GOTTO, A.M.; POWNALL, H.J.; HAVEL, R.J. - Introduction to the plasma lipoproteins. **Methods Enzymol.**, New York, v. 128, p. 3-41, 1986.

GREEN, P.H.R.; TALL, A.R.; GLICKMAN, R.M. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. **J.Clin.Invest.**, New York, v. 61, p. 528-534, 1978.

GREEN, P.H.R.; GLICKMAN, R.M.; SANDEK, C.D.; BLUM, C.B.; ALL, A.R. Human intestinal lipoproteins: studies in chylurie subjects. **J.Clin.Invest.**, New York, v. 64, p. 233-242, 1979.

GRUNDY S. M. Small LDL, Atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. **Circulation**, Dallas, v. 95, p. 1-4, 1997.

HAVEL, R.J. The formation of LDL: mechanisms and regulation. **J.Lipid.Res.**, New York, v. 25, p.1570-1576, 1984.

HIRATA, R.C.D.; HIRATA, M. H.; MESQUITA, C. H.; CESAR, T. B.; MARANHÃO, R. C. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1437, p.53-62, 1999.

JANERO, D.R.; SINTA-MGNANO, P.; MULLER, K.W. Synthesis, processing and secretion of hepatic very low density lipoprotein. **J.Cell Biol.**, New York, v. 24, p. 131-152, 1984.

JONES, A.L.; HRADEK, G.T.; HORNICK, C.; RENAUD, G.; WINDLER, E.E.; HAVEL, R.J. Uptake and processing of remnants of chylomicrons and very low density lipoproteins by rat liver. **J.Lipid.Res.**, New York, v. 25, p. 1151-1158, 1984.

KESANIEMI, Y.A.; WITZTUM, J.L.; STEINBRECHER, V.P. Receptor-mediated catabolism of low density lipoprotein in man. **J.Clin.Invest.**, New York, v. 71, p950-959, 1983.

- KOSTNER, G.M. Apolipoproteins and lipoproteins of human plasma: significance in health and in disease. **Adv.Lipid.Res.**, New York, v. 20, p. 1-43, 1983.
- KOBAYASHY,P.T.; SCHENEIDER, W.J.; HILLMAN, G.H.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. - Separate mechanisms for the uptake of high **J.Biol. Chem.**,Baltimore, v. 254, p.5498-5505, 1979.
- KNOTT, T.J.; PEASE, R.J.; POWELL, L.M. et al. Complete proteins sequence and identification of structural domains of human apolipoproteins B. **Nature**, London, v. 323, p.734-839, 1986.
- KUDCHODKAR, B. J.; SODHI, H. S. Plasma cholesteryl esters turnover in mam: comparison of in vivo and vitro methods. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.68, p.187-194, 1976.
- KURSI, A.; MYTHER, J., J.; GEHER. G. et al. Decreased plasma phosphatidyl choline/free cholesterol ratio as an indicator of risk for ischemic vascular disease. **Arteriosclerosis**, Shannon, v.2,p.296-222, 1982,
- MAHLEY, R.W.; INNERARITY, T.L. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. **Biochim.Byophys.Acta**, Amsterdam, v. 737, p.197-222, 1983.
- MAHLEY, R.W.; INNERARITY, T.L.; RALL, S.C.; WEISGRABER, K.H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. **J.Lipid.Res.**, New York, v. 25, p.1277-1294, 1984.
- McCALL, M. R.; NICHOLS, A. V.; NORTON, R. E.; BLANCHE, P. J.; SHORE, V. G.; HARA,S.; FORTE, T. M.Transformation of HepG2 nascent lipoproteins by LCAT: modulation by HepG2 d[>] 1,235 g/ml fraction. **J. Lipid Res.**,New York, v.34, p.37-48, 1993.

- MARANHÃO, R.C.; CESAR, T.B.; PEDROSO-MARIANI,S.; HIRATA, M. H.; MESQUITA, C. H..Metabolic behavior in rats of a non-protein microemulsion resembling low-density lipoprotein . **Lipids**, Champaing, v. 28, p.691-696, 1993.
- MARANHÃO, R. C., ROLAND, Y.; RAMIRES, J.; TOFFOLETO, O. GONÇALVES, R. P.; MESQUITA, C. H. PILEGGI, F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemia subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. **Lipids**, Champain, v.32, p.627-633,1997.
- MARSH, J.B. Lipoproteins in a nonrecirculating perfusate of rat liver. **J.Lipid.Res.**, New York, v. 15, p. 544-550, 1974.
- MATTHEWS, C,M,E, The theory of tracer experiments with ¹³¹I-labeled plasma proteins. **Phys.Med.Biol.**, London, v. 2, p. 36-53, 1957.
- MESQUITA, C.H. Cinética do quilomícron marcado com ³H-TG e ¹⁴C-CE. Análise compartimental auxiliar. **São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)**, 1994. [Publicações IPEN]
- MILLER M. Is hypertriglyceridemia an independent risk factor for coronary heart disease ? **Eur. Heart. J.**,London, v. 19 supl.,p. H18-H22, 1998.
- MURAKAMI,T.; MICHELAGNOLI, S.; LONGHI, R.; GIANFRANCHESCHI, G.; PAZZUCCONI, F.; CALABRESI, L.; SIRTORI, C.R.; FRANCHESCHINI, G. Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Dallas, v.15, p.1819-1828, 1995.
- PACKARD, C.J.; MUNRO, A.; LORIMER, A.R.; GOTTO, A.M.; SHEPHERD, J. Metabolism of apolipoprotein B in large triglyceride-

rich very low density lipoproteins of normal and hypertriglyceridemic subjects. **J.Clin.Invest.**, New York, v, 74, p. 2178-2192, 1984.

PAUCIULLO, P.RUBBA, P. MAROTTA, G. et al. Abnormalities in serum lipoprotein composition in patients with premature coronary heart disease compared to serum lipid matched controls. **Atherosclerosis**, Shannon, v.73, p.241-247, 1988

REDGRAVE, T.G.; MARANHÃO, R.C. Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. **Biochim.Biophys.Acta**, Amsterdam, v. 835, p.104-112, 1985.

RIFAI, N. Lipoproteins and apolipoproteins. **Arch.Pathol.Lab.Med.**, Chicago, v.110, p. 697-701, 1986.

SIEDEL, J.; SCHULUMBERGER, H.; KLOSE, S.; ZIEGENHORN, J.; WAHLEFELD, A.W. Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol. **J.Clin.Chem.Biochem.**, Berlin, v. 9, p.838-839, 1981.

STEINBERG, D.; PARTHA SARATHY, S.; CAREN, T. G.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. Beyond Cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increased its atherogenicity. **N.Engl. J. Med.**, Boston, v.320, p.915-924, 1989.

YANG, C.Y.; GU, Z.W.; WENG, S.Q.; KIM, T.W.; CHEN, S.H.; POWNALL, H.J.; SHARP, P.M.; LIN, S.W.; LI, W.H.; GOTTO Jr., A.M.; CHAN, L. - Structure of apolipoprotein B-100 of human low density lipoproteins. **Arteriosclerosis**, Dallas, v. 9, p.96-108, 1989.

YEN, T. F.; NISHIDA, T. Rapid labeling of lipoproteins in plasma radioactive cholesterol. Application for measurement of plasma cholesterol esterification. **J. Lipid Res.**, New York, v.31, p.349-353, 1990.

WALD, J. H.; KRUL, E. S.; JONAS, A. Structure of apolipoprotein A-1 in three homogeneous, reconstituted high density lipoprotein particles. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.32, p.20037-20043, 1990.

WAHLEFELD, A.W. - Triglycerides: colorimetric method. In: BERGMEIER, H.V., **Methods of enzymatic analysis**, 3th ed., Weinheim: verlag hemie, v.8, p. 12-28, 1985.

WEINTRAUB M. S., EISENBERG S., BRESLOW J. L. Different patterns of postprandial lipoprotein metabolism in normal, type IIa, type III, and type IV hyperlipoproteinemic individuals. Effects of treatment with cholestyramine and gemfibrozil. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 79, p. 1110-1119, 1987.