ARICIA HELENA GALVÃO GIRIBELA

**Avaliação da influência da menopausa no tamanho das
partículas da HDL e na sua capacidade de receber
lipídios de uma nanoemulsão semelhante à LDL**

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

Área de Concentração: Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberto de Melo

São Paulo

2007

DEDICATÓRIA

A meus pais:

Laerte Giribola e Maria Helena Giribola que sempre me estimularam, fizeram de mim quem sou, e em todos os momentos iluminaram meu caminho e orientaram meus passos.

.

À minha irmã Cassiana Giribela, companheira inseparável, exemplo de determinação, inteligência.

Sem seu apoio tese não seria possível.

Ao meu irmão Flavio, que inicia os passos na carreira médica sempre siga os caminhos com perseverança, esforço, e dedicação.

À minha avó Rosa Dinelli Galvão, que esteve presente em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr Nilson Roberto de Melo orientador, mestre, guia; amigo, não apenas pela orientação na realização e confecção da tese, mas por guiar meu caminho dentro da ginecologia e da medicina, desde o início da residência médica, servindo de modelo de integridade, honestidade, conhecimento, esforço, e trabalho.

Ao Professor Dr Raul C. Maranhão que me ensinou a mergulhar profundamente na pesquisa científica e com imensa paciência me guiou na realização do experimento.

Ao Professor Dr Edmund C. Baracat pelo apoio e estímulo.

Ao amigo Dr Marcos Desidério Ricci pela participação em todos os momentos desta tese com seu constante apoio e estímulo.

À Professora Dra Ângela Maggio da Fonseca pela oportunidade de realizar o doutorado no departamento de Ginecologia do HC FMUSP, e pela dedicação na revisão da tese.

Aos professores doutores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia que com dedicação, experiência e sabedoria, participaram da minha formação e continuam contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

A Sra Claudia A. Vieira, secretária da pós-graduação da ginecologia, pela seriedade, competência e dedicação.

A Sra Maria da Conceição Latrilha por sua dedicação e auxílio na realização do experimento.

As pacientes voluntárias do protocolo: sem elas nada teria sido possível.

A todos amigos que me apoiaram direta ou indiretamente durante a realização deste trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro.

Normalização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista das Abreviaturas

Lista das Tabelas

Lista das Figuras

Lista de Anexos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	8
2.1. Metabolismo lipídico e lipoproteínas.....	8
2.2. Estrutura da HDL.....	9
2.3. Metabolismo da HDL.....	11
3. OBJETIVOS.....	15
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
4.1. Casuística.....	16
4.2. Métodos.....	21
4.2.1. Avaliação laboratorial.....	21
4.2.1.1. Análises bioquímicas.....	21
4.2.1.2. Determinação do tamanho da partícula de HDL.....	22
4.2.1.3. Preparo da emulsão lipídica (LDE).....	23
4.2.1.4. Protocolo para medida da transferência de éster de colesterol, fosfolípidios, colesterol livre e triglicérides da nanoemulsão (LDE) para a HDL	25
4.3. Método estatístico	26

5. RESULTADOS.....	27
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÕES.....	41
8. ANEXOS.....	42
8.1. Anexo A. Aprovação Comitê Ética para Análise de Projetos de Pesquisa.....	42
8.2. Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	43
8.3. Anexo C.	48
8.4. Anexo D	50
8.5. Anexo E	52
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter-A1</i>
Apo A-I	Apolipoproteína AI
Apo A-II	Apolipoproteína AII
CE –	Éster de colesterol
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
CL	Colesterol livre
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IMC	Índice de massa corpórea
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Lipase hepática
LPL	Lipase lipoproteica
PLTP	Proteína transferência fosfolípido
PL	Fosfolípido
SR-B1	Receptor <i>scavenger</i> , classe B tipo 1
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
cm	centímetro
g/l	gramas por litro
kg	quilogramas

m	metros
m ²	metro quadrado
mg/dl	miligramas por decilitro
mmHg	milímetros de mercúrio
g/ml	gramas por mililitro
mol/l	mol por litro
nm	nanômetro
nmol/ml	nanomol por mililitro
rpm	rotações por minuto
µg	microgramas
UI/L	Unidades internacionais por litro

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores das médias e desvios-padrão das características físicas e parâmetros bioquímicos.....	20
Tabela 2. Valores das médias e desvios-padrão dos lipídios plasmáticos e apolipoproteínas	28
Tabela 3. Valores dos tamanhos em nanômetros (nm) das partículas de HDL entre os dois grupos estudados.....	29
Tabela 4. Transferência colesterol livre da LDE para HDL nos dois grupos estudados.....	30
Tabela 5. Transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL nos dois grupos estudados.....	31
Tabela 6. Transferência de fosfolipídios da LDE para HDL nos dois grupos estudados.....	32
Tabela 7. Transferência de triglicérides da LDE para HDL nos dois grupos estudados.....	33
Tabela C1. Iniciais dos nomes, idade, peso, altura, IMC, glicemia e FSH das mulheres do Grupo 1	48
Tabela C2. Iniciais dos nomes, idade, peso, altura, IMC, glicemia e FSH das mulheres do Grupo 2	49
Tabela D1. Perfil lipídico e apolipoproteínas Grupo 1.....	50
Tabela D2. Perfil lipídico e apolipoproteínas Grupo 2.....	51

Tabela E1. Tamanho da partícula de HDL e transferência de lipídios Grupo 1	
.....	52
Tabela E2. Tamanho da partícula de HDL e transferência de lipídios Grupo 2	
.....	53

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática do transporte reverso do colesterol.....	12
Gráfico 1. Tamanho das partículas de HDL entre os dois grupos.....	29
Gráfico 2. Transferência de colesterol livre da LDE para HDL.....	30
Gráfico 3. Transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL.....	31
Gráfico 4. Transferência de fosfolipídios da LDE para HDL.....	32
Gráfico 5. Transferência de triglicérides da LDE para HDL	33

Lista de anexos

Anexo A. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	42
Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	43
Anexo C. Descrição de características clínicas e valores dos parâmetros bioquímicos dos grupos estudados, com respectivas médias e desvios-padrão	48
Anexo D. Perfil lipídico e apolipoproteínas	50
Anexo E. Tamanho da partícula de HDL e transferência de lipídios.....	52

Resumo

Giribela, AHG. *Avaliação da influência da menopausa no tamanho das partículas da HDL e sua capacidade de receber lipídios de uma nanoemulsão semelhante à LDL* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Introdução: A concentração plasmática da HDL é um fator de risco importante e independente para a prevenção da doença aterosclerótica, principalmente na mulher. Seu metabolismo e suas características estruturais e funcionais também têm sido estudados como fatores de risco. Neste estudo, foram comparadas mulheres de mesma faixa etária na pré e na pós-menopausa, para determinar a influência da menopausa sobre o tamanho da HDL e sobre a habilidade desta lipoproteína em receber lipídios de lipoproteínas doadoras, um processo que depende de proteínas de transferência e da composição e estrutura da HDL.

Métodos: Vinte e duas mulheres saudáveis, normolipidêmicas na pré e dezoito na pós-menopausa, de idades entre 40-50 anos foram estudadas. Os grupos não diferiam em IMC, glicemia, colesterol total, LDL, triglicérides, apo A1 e apo B. Uma nanoemulsão artificial foi usada como modelo de LDL (LDE) para doar lípidos para a HDL. LDE marcada radioativamente com ^3H -triglicérides (TG) e ^{14}C -colesterol livre (CL) ou ^3H -ésteres colesterol (CE) e ^{14}C -fosfolipídios (PL) foram incubados com as amostras de plasma por 1 hora. Após a precipitação química do sobrenadante contendo HDL, foi contada a radioatividade. O tamanho da HDL foi medido por espalhamento da luz laser.

Resultados: A concentração da HDL nos dois grupos não diferiu, demonstrada pela concentração de HDL colesterol (61 ± 12 ; 61 ± 14 mg/dl respectivamente) e

concentração de apolipoproteína A-1 (1.5 ± 0.3 ; 1.5 ± 0.2 g/l). O tamanho da HDL também foi igual entre os dois grupos (8.8 ± 0.8 ; 9.0 ± 0.5 nm, respectivamente). A menopausa também não afetou a transferência de lípidos da LDE para a HDL (em % total de radioatividade/10mg HDL/h), CE (0.5 ± 0.3 ; 0.5 ± 0.2 , respectivamente), CL (0.9 ± 0.2 ; 0.9 ± 0.2), TG (0.6 ± 0.2 ; 0.6 ± 0.2) e PL (3.0 ± 0.7 ; 3.3 ± 1.0).

Conclusão: A menopausa não influenciou o tamanho das partículas HDL e um importante parâmetro funcional que é a habilidade da HDL de receber lipídios.

Descritores: menopausa; metabolismo dos lipídeos, colesterol HDL, triglicerídeos, fosfolipídeos, envelhecimento.

Summary

Giribela, AHG. Evaluation of menopause influence on HDL size and its ability of receiving lipids from a nanoemulsion resembling LDL [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007.

Objective: HDL levels are important for atherosclerosis prevention especially in the female gender, but functional aspects of the lipoprotein are also important. In this study, post-menopausal were compared to pre-menopausal women in the same age range to determine the influence of menopause upon the HDL size and ability of the lipoprotein to receive lipids from donor lipoproteins, a process that depends on transfer proteins and on HDL composition and structure.

Methods: Twenty-two pre and eighteen postmenopausal, healthy and normolipidemic women, aged 40-50 yr. Both groups did not differ in BMI and plasma glucose, total and HDL cholesterol, triglycerides and apo B concentration. An artificial nanoemulsion (LDE) was used as a model of LDL to donate lipids to HDL. LDE labeled with ^3H -triglycerides (TG) and ^{14}C -free cholesterol (FC) or ^3H -cholesteryl esters (CE) and ^{14}C -phospholipids (PL) incubated with plasma samples for 1h. After chemical precipitation, the supernatant containing HDL was counted for radioactivity. HDL size was measured by laser-light-scattering.

Results: HDL concentration of pre and post menopausal women did not differ as estimated by HDL cholesterol (61 ± 12 ; 61 ± 14 mg/dl respectively) and apo A1 concentration (1.5 ± 0.3 ; 1.5 ± 0.2 g/l). HDL size also did not differ (8.8 ± 0.8 ; 9.0 ± 0.5 nm, respectively). Menopause also did not affect the transfer of lipids from LDE to HDL (in % of total radioactivity/10mg HDL/h), namely CE (0.5 ± 0.3 ; 0.5 ± 0.2 ,

respectively), FC (0.9 ± 0.2 ; 0.9 ± 0.2), TG (0.6 ± 0.2 ; 0.6 ± 0.2) and PL (3.0 ± 0.7 ; 3.3 ± 1.0).

Conclusion: The menopause does not affect the size and an important functional parameter that is the ability of HDL to receive lipids.

Descriptors: menopause; lipid metabolism; cholesterol HDL; triglycerides; phospholipids; aging.

1. Introdução

O climatério é o período de transição entre a fase reprodutiva e a não reprodutiva da vida da mulher (World Health Organization,1996; Gracia et al., 2005; Lauritzen, 2005).

Define-se menopausa como ausência menstrual por período de 12 meses consecutivos, em consequência da redução espontânea da síntese ovariana dos esteróides sexuais, sem a presença de outros fatores biológicos identificáveis, portanto, representa uma data (World Health Organization,1996; Soules et al., 2001).

A menopausa divide o climatério em fases pré e pós-menopausa. A pré-menopausa representa um termo ambíguo, referindo-se em geral, ao período de um a dois anos antes da menopausa, ou a todo o período reprodutivo que anteceda a menopausa (World Health Organization,1996). A pós-menopausa implica na fase que começa após a interrupção da menstruação e se estende até os 65 anos de idade (World Health Organization,1996).

O termo perimenopausa determina o período imediatamente anterior à menopausa, quando se iniciam alterações endócrinas, biológicas e clínicas da proximidade desta, estendendo-se até o primeiro ano após a última menstruação (World Health Organization,1996).

Recente classificação utiliza o termo transição menopáusica para determinar a fase que se inicia com as alterações de intervalo do ciclo menstrual e termina com 12 meses de amenorréia (Soules et al., 2001).

Sugere-se que a idade da menopausa seja um marcador biológico do envelhecimento (Soules et al., 2001), cuja média de ocorrência varia de 48 a 52 anos, tendendo a ser menor em fumantes (Melo, 1999; The North American Menopause Society, 2007).

A idade da menopausa mantém-se estável ao longo dos séculos, mas a expectativa de vida da mulher vem aumentando, tendo como consequência maior contingente de mulheres nesse período, que passam a viver aproximadamente um terço de suas vidas em regime de deficiência hormonal (The North American Menopause Society, 2000).

A Doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morbidade e mortalidade em ambos os sexos no Brasil e em países desenvolvidos (Lotufo et al., 2005; Kannel e Levy, 2004).

A mulher é acometida pela doença arterial coronariana (DAC) mais tardiamente que o homem. Acredita-se que tal diferença esteja relacionada aos esteróides sexuais femininos, principalmente ao 17-beta estradiol, que apresenta vários possíveis mecanismos de proteção cardiovascular, incluindo a melhora no perfil lipídico e sua ação endotelial. Essa prevenção exercida pelo

estradiol deixa de ocorrer na pós-menopausa, quando ocorre a falência gonadal (Kannel e Levy, 2004).

Na mulher pode ocorrer atraso na manifestação da DAC de 10 a 15 anos em comparação com o homem (Kannel e Levy, 2004). Antes dos 50 anos, a DAC incide com frequência três vezes maior no sexo masculino do que no feminino porém, com o avançar da idade esta diferença diminui e aos 75 anos, a incidência iguala-se em ambos os sexos (DataSUS 2002).

A DCV é complexa e multifatorial, resultando da interação de diversos fatores de risco, tais como predisposição genética, idade, sexo, hipertensão arterial, dislipidemia, hipertrigliceridemia, diabete melito, obesidade, padrão andróide de distribuição da gordura, resistência à insulina, antecedentes familiares de DCV, além de fatores comportamentais, como estilo de vida sedentário, tipo de dieta, tabagismo e etilismo (Santos et al. 2000; Dressler e Santos, 2000; Hu et al., 2000).

A dislipidemia é o mais importante fator de risco para desenvolvimento prematuro da DCV. Este estado representa um desequilíbrio em favor de níveis circulantes de lipoproteínas pró-aterogênicas, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), em detrimento das antiaterogênicas como a lipoproteína de alta densidade (HDL). Estudos epidemiológicos com grande casuística revelaram que concentrações sanguíneas baixas de HDL constituem fator preditor de risco independente para DAC, mesmo na presença de níveis normais de colesterol total (Genest et al., 1999; Kontush e Chapman, 2006).

Na perimenopausa, descrevem-se alterações adversas no perfil lipídico com aumento nos níveis do colesterol total e da LDL, enquanto as concentrações da HDL permanecem inalteradas ou diminuídas (Matthews et al., 1989; Maas et al., 2004). Os resultados relacionados aos níveis plasmáticos de HDL, triglicérides e apolipoproteínas nessa época são discordantes (Welty, 2001). A concentração da HDL em mulheres é maior do que no sexo masculino, provavelmente, esta lipoproteína tem importante papel na menor susceptibilidade do sexo feminino à aterosclerose e DAC (Castelli et al., 1986).

O estudo populacional de Framingham estabeleceu a relação entre os níveis elevados de colesterol total e LDL com o aumento no risco de DCV, de morbidade e mortalidade cardiovascular em ambos os sexos, assim como o efeito protetor relacionado às concentrações da HDL (Kannel et al., 1976; Gordon et al., 1978).

As modificações nos níveis plasmáticos das lipoproteínas ocorrem com a idade de forma diferente em ambos os sexos. Após os 50 anos, os níveis de colesterol se estabilizam no homem e aumentam na mulher, assim como a LDL que também se eleva em média 2 mg/dl por ano entre 40 e 60 anos (Johnson et al., 1993; Welty, 2001). Em relação aos níveis de HDL, os resultados são discordantes, pois o estudo transversal “National Health and Nutrition Examination Surveys” demonstrou valores menores de HDL em homens do que em mulheres e estes não se alteraram com a idade, porém, em estudos longitudinais, de menor casuística, os níveis de HDL diminuíram na pós-menopausa (Johnson et al., 1993).

A concentração de HDL é inversamente relacionada ao risco de DAC, sendo fator independente e mais importante na mulher do que no homem (Welty, 2001; Mosca et al., 2004a). O estudo de Framingham demonstrou que apesar dos níveis de HDL no homem permanecerem estáveis com a idade e diminuírem na mulher, ainda assim o sexo feminino apresenta, mesmo após a menopausa, aproximadamente 10 mg/dl a mais desta lipoproteína. Esse estudo analisou o risco de DAC relacionado à HDL em ambos os sexos, entre 50 a 90 anos, demonstrando que o aumento de 1 mg/dl na HDL na mulher associou-se a redução de 3% no risco, enquanto no sexo masculino essa diminuição foi de 2% (Legato, 2000). Esse estudo também estabeleceu a correlação entre HDL e triglicérides como fatores preditores de risco em ambos os sexos e de forma independente do colesterol total (Castelli et al., 1992), sendo considerados melhores marcadores de risco do que a LDL e o colesterol total (Bass et al., 1993; Hokanson et al., 1996).

A avaliação dos efeitos da menopausa no perfil lipídico é dificultada, pois, o envelhecimento também exerce influência similar (Stevenson et al., 1993; Abbey et al., 1999; Peters et al., 1999).

O envelhecimento na mulher associa-se a concentrações elevadas de triglicérides, colesterol total e LDL, além de taxas diminuídas de HDL, principalmente a sub-fração HDL₂, podendo essas alterações contribuir para tornar o perfil lipídico mais aterogênico (Stevenson et al., 1993).

Em estudos observacionais, transversais e ensaios clínicos no período pós-menopáusico descreveram-se alterações adversas no perfil lipídico, com aumento dos níveis séricos de colesterol total e resultados variáveis em relação às modificações da LDL, HDL e dos triglicérides (Matthews et al., 1989; Bittner, 2002; Guthrie et al., 2004).

Stevenson et al.(1993) avaliaram os efeitos da idade no perfil lipídico em 542 mulheres na pré e pós-menopausa, saudáveis, não-obesas, cujas idades variaram entre 18 a 70 anos. Associaram o aumento da idade com concentrações maiores de colesterol total, LDL, HDL₃ e triglicérides e níveis diminuídos de HDL₂. As mulheres na pós-menopausa apresentaram concentrações mais altas de colesterol total, triglicérides, LDL e HDL₃, enquanto as de HDL e HDL₂ eram mais baixas. Estas diferenças eram independentes da idade, do índice de massa corpórea (IMC) e de outras variáveis. Nesse estudo, a menopausa associou-se a alterações nos lipídios e nas lipoproteínas, independentes de quaisquer efeitos da idade.

Os estrogênios apresentam ações genômicas, como o remodelamento das lipoproteínas, que têm duração prolongada e início tardio (Tostes et al.,2003), destacando-se o estímulo na síntese hepática de triglicérides, elevação na produção e secreção de VLDL; aumento na síntese dos receptores de LDL, favorecendo o catabolismo da LDL; inibição da síntese da lipase hepática, diminuindo sua atividade, o que resulta em elevação na concentração da HDL (Tikkanen et al., 1998); estímulo na produção de apo-AI e inibição da síntese de receptor “scavenger” classe B tipo 1 (SR-B1), causando aumento na

concentração de HDL; inibição da síntese de lipase lipoprotéica (LPL) no tecido adiposo abdominal, reduzindo o depósito de triglicérides nesta região e atividade anti-oxidante, diminuindo a oxidação da LDL (Berg et al., 2005).

O estudo dos mecanismos antiaterogênicos ligados às atividades funcionais das partículas de HDL na mulher na pós-menopausa é complexo, pois, envolve a interação de muitos fatores que interferem no perfil lipídico e possivelmente nas funções desta partícula.

2. Revisão de Literatura

2.1. Metabolismo lipídico e lipoproteínas

O colesterol é componente essencial das membranas plasmáticas, sendo precursor dos ácidos biliares e esteróides sexuais, não sendo solúvel em água, portanto, para ser transportado no sangue, necessita associar-se aos triacilgliceróis em partículas denominadas lipoproteínas (O'Brien e Nguyen, 1997; Parks, 2001).

A homeostase do colesterol no plasma e nos tecidos é regulada por processos fisiológicos complexos que envolvem a síntese e secreção de lipoproteínas, atividade de receptores celulares específicos para as lipoproteínas, atividade de enzimas lipolíticas e de proteínas de transferência de lipídios (Chan et al., 2003).

As lipoproteínas de acordo com sua densidade podem classificar-se em quilomícrons, VLDL, LDL, IDL e HDL, sendo que o transporte do colesterol é feito em aproximadamente 65% pela LDL e 25% pela HDL (Wang e Briggs, 2004).

As lipoproteínas têm um núcleo hidrofóbico composto de triacilgliceróis e ésteres de colesterol envoltos por uma superfície hidrofílica de colesterol livre, não esterificado, fosfolipídios e apolipoproteínas. Essas partículas têm

composição diversa, por isso diferem entre si em densidade, tamanho e migração eletroforética (Wang e Briggs, 2004).

As apolipoproteínas presentes na superfície das lipoproteínas determinam as características do padrão metabólico destas partículas, promovem a solubilização, interação com os fosfolipídios, ligação a receptores celulares e regulam a atividade de algumas enzimas (von Eckardstein, 2005).

2.2. Estrutura da HDL

A fração HDL é composta por partículas obtidas por ultracentrifugação do plasma, constituindo as lipoproteínas de maior densidade, que variam de 1,063 a 1,210 g/ml, e as de menor tamanho oscilam de 7 a 12 nanômetros (nm) (Barter, 2002).

A HDL é a lipoproteína mais abundante na circulação, existindo 10 a 20 vezes mais partículas dessa lipoproteína do que a soma de todas as outras (Eisenberg, 1984).

As partículas de HDL são originadas a partir de um complexo fosfolipídio-apolipoproteína pobre em lipídios, de forma discóide, sendo denominada HDL-nascente (Lewis e Rader, 2005).

A HDL, em sua forma madura, é formada por partículas esféricas, cuja estrutura consiste em um núcleo lipídico hidrofóbico, contendo principalmente ésteres de colesterol, triacilgliceróis e colesterol não-esterificado e uma

superfície hidrossolúvel composta por camada de fosfolipídios, colesterol não-esterificado e apolipoproteínas principalmente apo A-I (Tailleux e Fruchart, 1996; Lewis e Rader, 2005).

As principais apolipoproteínas constituintes da HDL são apo A-I e apo A-II, embora outras, como apo A-IV, apo A-V, apo C-I, apo C-II, apo C-III, apo D e apo E, possam estar presentes (Tailleux e Fruchart, 1996; Barter, 2002).

A maioria das partículas de HDL contém apo A-I como proteína predominante, responsável por aproximadamente 70% da proteína total da lipoproteína (Barter, 2002).

Apo A-I e Apo A-II exercem ações biológicas, tais como inativação ou ativação de enzimas e ligação aos receptores (von Eckardstein, 2005).

A HDL forma uma classe heterogênea de partículas do ponto de vista funcional e estrutural, que podem ser fracionadas em subclasses, por diferentes técnicas (Barter, 2002).

A HDL pode ser fracionada por métodos baseados na densidade, tamanho, conteúdo de lipoproteínas ou carga elétrica (Eisenberg, 1984). A ultracentrifugação separa essa lipoproteína em duas classes, a HDL₂ (1.063-1.125 g/ml; 9-13 nm) maior e menos densa, rica em apo A-I, e a HDL₃ (1.125-1.21 g/ml; 7-9 nm) menor e mais densa (Rye et al., 1999; Lima e Maranhão, 2004). A eletroforese em sistema de gel de poliacrilamida não-desnaturante, baseia-se no tamanho e carga elétrica da partícula para sua separação, fracionando a HDL em cinco subtipos distintos: a HDL_{2b} (diâmetro médio

10,6nm), HDL_{2a} (9,2nm), HDL_{3a} (8,4nm), HDL_{3b} (8nm) e HDL_{3c} (7,6nm) (Blanche et al., 1981).

A separação das subfrações da HDL baseada no tamanho tem sido realizada por eletroforese em sistema de gel de poliacrilamida não-desnaturante e, mais recentemente, por espectroscopia em ressonância nuclear magnética, porém, são procedimentos trabalhosos e de alto custo (Lima e Couto, 2006).

Outro método de separação das subfrações da HDL é o espalhamento da luz laser, que inicialmente foi utilizado para a medida do tamanho das partículas de LDL. Existe grande similaridade entre os dados obtidos com esta técnica e as da eletroforese não desnaturante em gradiente gel. Lima e Maranhão (2004) empregaram esse método para medir o tamanho das partículas de HDL, com a particularidade de ser essa técnica mais prática e menos dispendiosa do que as anteriores.

Não há concordância entre as investigações sobre as subfrações da HDL e o risco cardiovascular, pois, as mesmas são heterogêneas e contêm uma variedade de subespécies diferentes, com funções fisiológicas distintas (Asztalos, 2004).

2.3. Metabolismo da HDL

As funções da HDL nos mecanismos de proteção cardiovascular são: o transporte reverso do colesterol, ação antioxidante sobre a LDL, preservação da

função endotelial e ação antiinflamatória, protegendo células e órgãos (von Eckardstein et al., 2005).

A HDL serve como transportadora plasmática eficaz de proteínas envolvidas com o metabolismo lipídico, como a proteína transportadora de éster de colesterol (CETP), a lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e a proteína transportadora de fosfolipídios (PLTP), que participam ativamente das vias metabólicas da HDL, sendo uma das mais importantes o transporte reverso do colesterol (Marmillot et al., 2007), que é o processo através do qual o colesterol é transportado das células periféricas para o fígado (Glomset, 1968) (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática do transporte reverso do colesterol (Rader, 2006)

A partícula inicial da HDL tem forma discóide, é pobre em lipídios, contendo aproximadamente 70% de apo-AI e liga-se a um transportador de membrana plasmática, denominado ATP “*binding cassette*” A-1 (ABCA-1), causando a translocação de colesterol livre e fosfolipídios da membrana para a lipoproteína nascente. A enzima LCAT esterifica o colesterol, que é hidrofóbico, direcionando-o para o interior da partícula, tornando-a mais esférica e progressivamente maior, transformando-a em HDL₃, que apresenta pequena quantidade de lipídios. Por ação dessa mesma enzima, essa lipoproteína aumenta de tamanho pela captação de éster de colesterol, passando a denominar-se de HDL₂, que tem maior tamanho. Esta, pela ação da CETP, troca o colesterol por triglicérides contidos nas lipoproteínas que contenham apo B, que são os quilomícrons, VLDL e remanescentes de quilomícrons e de VLDL, ricas em triglicérides, reduzindo o conteúdo de colesterol das HDL. O ciclo reverso de colesterol completa-se quando as partículas de HDL são captadas pelos receptores hepáticos SR-B1, que removem seu conteúdo de colesterol, iniciando a excreção do mesmo pela bile e reiniciando o processo de maturação da HDL (von Eckardstein et al., 2001; Fredenrich e Bayer, 2003; Marmillot et al., 2007).

Todas as subpopulações de HDL e quase todas as apolipoproteínas podem ser aceptoras de colesterol, porém, alguns tipos são mais eficientes que outros (Barter e Rye, 2006). Diferenças no tamanho, na composição protéica e lipídica são fatores determinantes na capacidade da partícula de HDL em obter

o colesterol das membranas plasmáticas (von Eckardstein et al.,2001; Barter e Rye, 2006).

O mecanismo antiaterogênico da HDL ainda não é totalmente compreendido, mas acredita-se que seja mais dependente de seus aspectos funcionais do que de sua concentração (Barter e Kastelein, 2006).

Kannel et al. (1976) avaliaram pacientes de mesma faixa etária, subdivididas em um grupo na pré e outro na pós-menopausa. Verificaram que este último apresentava o dobro de incidência de doença cardiovascular comparativamente com o da pré-menopausa, porém havia entre os mesmos, diferenças importantes nos níveis séricos de lipoproteínas e triglicérides, que foram atribuídos à redução das concentrações hormonais na pós-menopausa.

Até o presente momento, não há investigação sobre o tamanho da partícula da HDL e a transferência de lipídios de outras lipoproteínas para a esta, em mulheres com a mesma faixa etária, subdivididas em grupos na pré e pós-menopausa, com características clínicas semelhantes e com níveis de lipoproteínas similares, com a finalidade de analisar se a função da HDL altera-se com a falência gonadal. Tal fato motivou o presente estudo.

3. Objetivos

Observar a influência da menopausa:

1. Sobre o tamanho das partículas da HDL, medidas pelo método de espalhamento de luz laser.
2. Sobre a capacidade da HDL em receber colesterol livre, éster de colesterol, fosfolipídios e triglicérides da nanoemulsão contendo LDE, lipoproteína de estrutura semelhante à LDL.

4.Casuística e Métodos

4.1. Casuística

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sob protocolo nº 414/04 (Anexo A).

Realizou-se estudo prospectivo na Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP e no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração da FMUSP. Incluíram-se mulheres com idade entre 40 e 55 anos, que desejavam participar do projeto.

Selecionaram-se as pacientes no Ambulatório de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e a realização do experimento ocorreu no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração da FMUSP, o estudo teve início em outubro de 2004, encerrando-se em outubro de 2005.

Todas as mulheres foram informadas a respeito da natureza do estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

Obedeceram-se os seguintes critérios de inclusão:

- Desejo de participar do protocolo de pesquisa

- Ausência de doenças conhecidas, que pudessem interferir no metabolismo lipídico ou lipoprotéico
- Idade entre 40 e 55 anos
- Não estar utilizando nenhum método contraceptivo hormonal ou terapêutica hormonal nos últimos seis meses
- Colesterol total até 200 mg/dl (Mosca et al, 2004b)
- Triglicérides até 150 mg/ dl (Mosca et al, 2004b)
- TSH em concentrações plasmáticas normais
- Índice de Massa Corpórea até 30kg/m^2

Obedeceram-se os seguintes critérios de exclusão:

- Antecedentes pessoais de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, tromboembolismo venoso ou arterial, cardiopatias, diabetes melito, hipertensão arterial sistêmica, hepatopatias e nefropatias agudas ou crônicas, doenças tireoidianas, neoplasias malignas
- Uso de contraceptivos hormonais ou terapia hormonal, nos últimos seis meses
- Etilismo
- Tabagismo
- Hipercolesterolemia (colesterol total acima de 200 mg/dl)
- Hipertrigliceridemia (triglicérides acima 150 mg/dl)
- Obesidade (Índice de massa corpórea acima de 30kg/m^2)

- Uso de drogas hipolipemiantes
- Gravidez e amamentação

O critério de exclusão para hipertensão arterial sistêmica foi o de níveis iguais ou maiores a 140 milímetros de mercúrio para a pressão sistólica e de 90 milímetros de mercúrio para a diastólica (Whitworth et al 2004).

Para avaliação de obesidade foi utilizado o índice de massa corpórea ou de Quetelet, que se obtém através da fração peso corpóreo em quilogramas (kg) dividido pela altura (h) ao quadrado. Consideraram-se os valores segundo a classificação proposta por Kolpeman (1994):

- Não obesa: IMC inferior a 30 kg/m^2
- Obesa: IMC igual ou superior a 30 kg/m^2

Analisou-se a glicemia de jejum, com a finalidade de excluir diabetes melito, cujos valores não deveriam ser superiores a 110 mg/dl (Harris, 2004)

Todas as voluntárias submeteram-se a anamnese, exames físico e ginecológico, registrando-se a idade, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC), circunferência abdominal (CA) e pressão arterial sistêmica.

Realizaram-se os seguintes exames laboratoriais: glicemia de jejum, colesterol total e frações, triglicérides, apo A-I, apo B, TSH e FSH.

Após a análise dos resultados dos exames laboratoriais as mulheres que preenchiam os critérios de inclusão eram orientadas a retornar com 12 horas de

jejum para nova coleta de sangue, para análise do tamanho das partículas de HDL e da capacidade desta em receber lipídios.

Selecionaram-se 40 mulheres que foram alocadas em dois grupos, denominados de Grupos 1 e 2 (Anexos C e D), compostos de mulheres de faixa etária e características clínicas similares relatadas na Tabela 1. Nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação ao peso, altura, IMC, CA e glicemia de jejum. Compôs-se o Grupo 1 de 22 mulheres que apresentaram FSH < 30 UI/L (Anexo C, Tabela C1) e ciclos menstruais regulares. O Grupo 2 constituiu-se de 18 mulheres com data da última menstruação há pelo menos um ano e FSH superior a 30UI/L (Anexo C, Tabela C2). As mulheres do grupo 2 apresentavam tempo médio de menopausa de $3\pm 2,2$ anos (Anexo C, Tabela C2).

Tabela 1 - Valores das médias e desvios-padrão das características físicas e parâmetros bioquímicos

PARÂMETROS	Grupo 1		Grupo2		p
Número de mulheres	n=22		n=18		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Idade (anos)	45,05	3,02	48,28	3,14	** 0,02
Peso (kg)	61,54	8,20	63,11	8,23	0,55
Altura (m)	1,57	0,07	1,60	0,06	0,074
IMC (kg/m ²)	24,92	2,60	24,53	2,95	0,655
Circunferência	81,00	10,40	83,06	8,38	0,512
Abdominal (cm)					
Glicemia Jejum (mg/dl)	85.59	9,12	85.54	6,83	0,586
FSH (UI/L)	9,20	9,50	71,00	19,80	-
Tempo de pós-menopausa (anos)	-		3,1	2,2	-

4.2. Métodos

4.2.1. Avaliação Laboratorial

4.2.1.1. Análises Bioquímicas

Coletaram-se amostras de sangue, em veia periférica do membro superior, após jejum de 12 horas em tubos contendo EDTA.

Utilizou-se método enzimático colorimétrico para a determinação do colesterol total e triglicérides através de kits comerciais CHOD-PAP e GPO/PAP respectivamente (Laboratórios Roche-Suíça) (Anexo D, Tabela D1 e D2).

Determinou-se a concentração da HDL pelo mesmo método usado para determinação do colesterol total, após precipitação das lipoproteínas que continham apo B (VLDL e LDL) do plasma total pela adição de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio, seguidos de centrifugação do plasma a 3500 rotações por minuto durante um quarto de hora, momento em que se obteve a HDL no sobrenadante (Anexo D, Tabela D1 e D2).

Obteve-se a determinação da LDL aplicando-se a fórmula de Friedewald (Friedewald et al., 1972):

$LDL = \text{colesterol total} - (\text{triglicérides}/5 + HDL)$, com valores de triglicérides menores que 400 mg/dl, como aconteceu em todos os casos avaliados (Anexo D, Tabela D1 e D2).

Calculou-se o valor da VLDL através da divisão dos triglicérides por cinco, com valores de triglicérides menores que 400 mg/dl, como aconteceu em todos os casos analisados (Anexo D, Tabela D1 e D2).

Avaliaram-se as determinações de apolipoproteínas A-I e B por imunodifusão radial simples, empregando-se placas específicas onde se fizeram leituras dos diâmetros dos anéis de precipitação após 72 horas para as apo A-I e de 96 horas para as apo B. As determinações das apo A-I foram efetuadas utilizando-se as placas M-Partigen (Boehringer-Alemanha). Os valores considerados normais variaram de 0,9 a 2,10 g/l. Para determinação das apo B empregaram-se as placas Nor-Partigen (Boehringer-Alemanha). Os valores considerados normais variaram de 0,45 a 1,60 g/l (Anexo D, Tabela D1 e D2).

4.2.1.2. Determinação do tamanho da partícula de HDL

Para análise do tamanho das partículas de HDL, foi necessário o isolamento desta fração através da adição de 0,5 ml de solução de polietilenoglicol (Merk-Schuchardt) 8000 (200 g/l), a 0,5 ml das amostras de sangue com EDTA. Essa mistura foi centrifugada a 1800 rotações por minuto

(rpm), durante 10 minutos a 25°C em microcentrífuga (Modelo 5415 C; Eppendorf). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em uma solução de 1,5 ml contendo 10nmol/l de NaCl e 0,01% de EDTA (pH 7,5) e a seguir, foi purificada através do filtro Millipore® de 0,22µm para retirar partículas de poeira.

Determinou-se o tamanho das partículas de HDL através do equipamento ZetaPALMS Zeta Potencial Analyser (Brookhaven Instruments Corporation). Esse aparelho usa um laser de hélio néon de 29 mW a 658 nm para excitar as amostras, espalhando a luz, que é coletada em um ângulo de 90° por um tubo fotomultiplicador, que é um contador de fótons, sendo então direcionada a um programa de computador (BIC medidor de partículas), que correlaciona-a com o tamanho da partícula. O resultado de cada amostra é expresso na média após 5 medidas.

Utilizaram-se nanoesferas disponíveis em tamanhos padronizados de $92\pm 3,7$ nm (Duke Scientific. Palo Alto. CA), com a finalidade de se verificar a acurácia do equipamento (Anexo E, Tabela E1 e E2).

4.2.1.3. Preparo da emulsão lipídica (LDE)

A nanoemulsão utilizada neste estudo foi preparada a partir de mistura lipídica constituída de 20 mg de oleato de colesterol (éster de colesterol), 40 mg fosfatidilcolina (fosfolipídio), 1 mg trioleína (triglicéride) e 0,5 mg colesterol livre

adquiridos de Sigma®-EUA. Adicionaram-se à mistura, lipídios radioativos: ^{14}C -colesterol, ^3H -oleato de colesterol, ^{14}C -fosfatidilcolina e ^3H -trioleína adquiridos da Amersham International-UK. As misturas foram submetidas à emulsificação e purificação de acordo com o procedimento descrito por Maranhão et al (1994).

Os materiais e instrumentos utilizados na preparação das nanoemulsões foram submetidos a despirogenização e autoclavagem. As misturas lipídicas foram secas sob fluxo de nitrogênio, seguindo-se de dessecação a vácuo a 40°C , por um período de pelo menos 12 horas, com a finalidade de remover os solventes residuais. Os lipídios secos eram colocados novamente em suspensão em 10 ml de 0,01 M Tris-HCl, em pH 8 e a suspensão submetida a irradiação ultra-sônica usando um Disruptor Celular Branson modelo 450, com saída de 125 Watts no modo de operação "contínuo", por um período de 180 minutos sob atmosfera de nitrogênio. A temperatura era mantida acima de 52°C , para manter o oleato de colesterol acima do seu ponto de fusão, monitorizada por um termômetro de ponta que era inserido nos frascos durante o procedimento. A emulsão lipídica em suspensão era transferida para tubos apropriados para ultracentrifugação a $195000 \times g$, por um período de 30 minutos, a 4°C , utilizando rotor TH 641 (Sorvall) de ultracentrífuga.

Removeu-se a parte superior da solução, que continha partículas que flutuavam na densidade de aproximadamente 1,006 g/ml e a seguir, adicionou-se KBr sólido para ajustar a densidade da solução restante para 1,21 g/ml. Realizou-se uma segunda etapa de ultracentrifugação a $195000 \times g$ durante

120 minutos a 4°C, coletando-se 20 a 30% da parte superior do tubo após atingir a temperatura ambiente. Removeu-se o KBr através de filtração em coluna de Sephadex G-25, equilibrada e eluída com solução fisiológica estéril. Esterilizou-se a solução resultante por passagem através de filtro Millipore®, contendo poros de 0,22µm. Determinou-se a composição lipídica por métodos laboratoriais de rotina, utilizando-se a emulsão no prazo de 1 semana.

4.2.1.4. Protocolo para medida da transferência de éster de colesterol (CE), fosfolipídios e colesterol livre (CL) da nanoemulsão (LDE) para a HDL

Para determinar a habilidade da HDL em receber lipídios da nanoemulsão radioativa, coletaram-se amostras sangüíneas em tubos contendo 0,15% de EDTA, obtendo-se o plasma pela centrifugação a 2.500 rpm durante 15 minutos à temperatura de 4°C. Em seguida, pipetaram-se 0,2 ml de plasma e 0,05 ml da nanoemulsão marcada com ³H-oleato colesterol e ¹⁴C-colesterol ou ¹⁴C-fosfatidilcolina e ³H-trioleína em tubo de ensaio, que foram colocados em agitação e incubados durante 60 minutos a 37°C. Adicionou-se solução de 0,250 ml contendo 0,02% de sulfato de dextran e 0,3 mol/l de MgCl₂ ao tubo de ensaio, que foi agitado em vortex por 30 segundos. Centrifugou-se a amostra a 3000 rpm durante 10 minutos, transferindo-se 0,250 ml do sobrenadante, que continha a fração plasmática HDL ao qual foi adicionada a solução cintiladora,

agitando-se vigorosamente esta solução e deixando-a em repouso por no mínimo 45 minutos.

Determinou-se a radioatividade por meio do cintilador Packard 1660 (Meridien, CT), calculando-se a aceitação de lipídios da nanoemulsão pela HDL como a porcentagem de um lipídio marcado na nanoemulsão encontrado na fração plasmática da HDL sendo expressa como porcentagem de colesterol livre transferido para a HDL/ml (Anexo E, Tabela E1 e E2).

4.2.2. Método Estatístico

As variáveis quantitativas foram apresentadas descritivamente em tabelas contendo média e desvio-padrão.

As variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas com o teste t-Student, caso contrário, utilizou-se o teste não paramétrico da soma de postos de Wilcoxon (Rosner, 2004)

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. Resultados

No tocante ao perfil lipídico e de lipoproteínas não se encontraram diferenças significativas entre os grupos em relação às concentrações de colesterol total, LDL, VLDL, HDL e triglicérides, assim como nos valores de apo B e apo A-I (Tabela 2).

A Tabela 3 mostra que o tamanho das partículas de HDL foi similar nos dois grupos. No Grupo 1 a HDL teve o diâmetro médio, em nanômetros, de $8,96 \pm 0,51$ e no Grupo 2 de $8,81 \pm 0,76$.

As Tabelas 4, 5, 6 e 7 demonstram as porcentagens de lipídios radiativos da LDE, que foram transferidos da nanoemulsão para a fração plasmática da HDL. A porcentagem total de colesterol livre, colesterol esterificado, fosfolipídios e triglicérides da LDE que foram recebidos pela fração HDL não apresentou diferença significativa entre os dois grupos. Os Gráficos 1, 2, 3, 4 e 5 ilustram os resultados supracitados.

Tabela 2-Valores das médias e desvios-padrão dos lipídios plasmáticos e apolipoproteínas

Parâmetros	Grupo 1		Grupo2		<i>p</i>
	n=22		n=18		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Colesterol Total (mg/dl)	188,32	23,48	177,50	23,45	0,118
HDL (mg/dl)	61,32	12,70	61,06	14,26	0,951
LDL (mg/dl)	103,59	35,26	100,78	24,11	0,775
VLDL(mg/dl)	24,91	23,37	17,94	9,59	0,320
Triglicérides (mg/dl)	97,73	40,79	80,00	32,97	0,108
Apolipoproteína A ₁ (g/l)	1,56	0,26	1,52	0,22	0,526
Apolipoproteína B (g/l)	0,91	0,23	0,81	0,21	0,158

Tabela 3 - Valores dos tamanhos em nanômetros (nm) das partículas de HDL dos dois grupos estudados

	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p
Grupo 1	22	8,96	0,51	7,8	10,1	0,439
Grupo 2	18	8,81	0,76	7,9	10,7	

Teste t de Student

Gráfico 1 - Valores das médias de tamanho em nanômetros (nm) das partículas de HDL entre os dois grupos estudados

Tabela 4 - Transferência de colesterol livre (CL) da LDE para HDL nos dois grupos estudados

	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p
Grupo 1	22	5,55	4,38	7,45	0,302
Grupo 2	18	5,06	4,41	7,56	
Soma de postos de Wilcoxon					

Gráfico 2 - Transferência de colesterol livre da LDE para HDL nos dois grupos estudados

Tabela 5 - Transferência de ésteres de colesterol (CE) da LDE para HDL nos dois grupos estudados

GRUPOS	n	Mediana	Mínimo	Máximo	p
1	22	3,01	1,07	8,47	0,550
2	18	2,66	0,97	4,06	
Soma de postos de Wilcoxon					

Gráfico 3 - Transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL nos dois grupos estudados

Tabela 6 - Transferência de fosfolipídios da LDE para HDL nos dois grupos estudados

	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p
Grupo 1	22	17,79	2,11	13,04	22,00	0,117
Grupo 2	18	18,83	1,95	14,96	21,74	

Teste t de Student

Gráfico 4 - Transferência de fosfolipídios (PL) da LDE para HDL nos dois grupos estudados

Tabela 7 - Transferência de triglicérides da LDE para HDL nos dois grupos estudados

	n	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p
Grupo 1	22	3,64	0,72	2,04	5,32	0,793
Grupo 2	18	3,57	0,92	2,08	5,32	

Teste t de Student

Gráfico 5 - Transferência de triglicérides da LDE para HDL nos dois grupos estudados

6. Discussão

As mulheres no período reprodutivo têm menor incidência de doença cardiovascular do que os homens de mesma idade, porém, após a menopausa, paulatinamente perdem essa proteção (Kannel e Wilson, 1995; Poehlman et al., 1997).

Ao compararem-se os níveis de lipoproteínas em mulheres de mesma idade, após separá-las em dois grupos, um na pré e outro na pós-menopausa, obtém-se que, em geral, o composto por mulheres na pré-menopausa apresenta níveis de colesterol total e de LDL inferiores aos da pós-menopausa, sendo que as concentrações séricas de HDL permanecem estáveis (Peters et al., 1999; Nerbrand et al., 2004) ou sofrem ligeiro declínio na pós-menopausa, assim como os de triglicérides ficam estáveis ou se elevam nessa fase (Mattews et al., 1989; Stevenson et al., 1993; Poelman et al., 1997). A diferença entre esses dois períodos pode relacionar-se ao nível de estrogênio endógeno, visto que, na pós-menopausa há falência gonadal, resultando em hipoestrogenismo (Matthan et al., 2005).

A elevação da concentração do colesterol total em mulheres na pós-menopausa quando comparada a mulheres na pré-menopausa é observada em estudos transversais e longitudinais (Wu et al., 1990; Stevenson et al., 1993; Davis et al., 1994).

Essas alterações são estabelecidas de forma definitiva nos cinco primeiros anos após a menopausa. Mercurio et al. (2003) demonstraram tais

modificações a partir de seis meses da falência gonadal. Fukami et al. (1995), avaliaram 16 mulheres em estudo longitudinal e verificaram que o colesterol total e a LDL aumentaram logo após a menopausa em 20% e 14%, respectivamente. A variação do colesterol total ocorre rapidamente, desde um ano antes até um ano após a menopausa, enquanto a alteração da LDL é mais lenta, porém constante, iniciando-se quatro anos antes até quatro anos após a menopausa. Os valores médios da HDL e de triglicérides não variaram em relação aos anos após a menopausa.

Em nossa investigação, as concentrações séricas da LDL-C, VLDL-C, HDL-C, apo A-I e apo-B não sofreram alterações com significância estatística entre os Grupos 1 e 2, provavelmente em decorrência do rigor nos critérios de inclusão não permitir a inclusão de mulheres com níveis elevados de colesterol total e de triglicérides. Deve-se lembrar, que em nosso estudo o tempo médio de pós-menopausa foi de três anos no grupo 2, o que permitiu que essas alterações já estivessem estabelecidas e estáveis.

Durante a vida da mulher, o nível plasmático da HDL é maior que no homem, tendo importante papel na menor susceptibilidade do sexo feminino à aterosclerose e DAC. Enfatiza-se o metabolismo das lipoproteínas como fator importante de risco cardiovascular, visto que podem ocorrer eventos coronarianos em portadoras de HDL em concentrações normais (Carr et al., 2002; Lima e Couto, 2006).

Na presença da hipertrigliceridemia, a concentração da HDL diminui e aumenta quando os triglicérides diminuem (Yang et al., 2005), efeito conhecido como gangorra. Esses mesmos autores demonstram maior correlação entre os níveis séricos de triglicérides e a distribuição do tamanho das partículas de HDL do que as concentrações de colesterol total e relacionam tais modificações ao transporte reverso do colesterol deficitário, causando maior risco aterogênico (Yang et al., 2005).

A proporção das subclasses da HDL relaciona-se às alterações das concentrações de triglicérides, colesterol total, HDL e LDL. Cheung et al. (1999) demonstraram que a distribuição das subclasses da HDL correlaciona-se mais à DCV do que a redução de suas concentrações plasmáticas, sendo que ainda não se esclareceu a base fisiológica desta teoria.

Deve-se relatar que poucos estudos compararam mulheres na pré e pós-menopausa quanto aos aspectos qualitativos e funcionais da HDL nesse período de vida, quando se descrevem alterações no metabolismo lipídico (Li et al., 1996; De Oliveira e Silva et al., 1999; Berg et al., 2001; Ushiroyama et al., 2005).

Ushiroyama et al. (2005) avaliaram o tamanho das partículas de HDL e a correlação com triglicérides em mulheres na pré e pós-menopausa. A concentração de HDL₂ foi maior e a de HDL₃ menor, na presença de níveis menores de triglicérides. Esse estudo demonstrou que o tamanho das partículas de HDL varia de forma dependente dos níveis de triglicérides, além

de indicar que a hiperlipidemia na pós-menopausa reflete alterações qualitativas da HDL.

Incluíram-se, em nossa investigação, mulheres saudáveis com colesterol inferior a 200 mg/dl e triglicérides menores que 150 mg/dl. Esta estratégia teve a finalidade de excluir os efeitos secundários da menopausa nas concentrações e nos aspectos funcionais da HDL derivados de alterações em outras classes de lipoproteínas, sendo esta uma forma inédita de comparação em mulheres de mesma faixa etária em fases hormonais distintas.

Outra exigência na seleção das participantes deste estudo foi a idade, pelos efeitos do envelhecimento nos níveis séricos dos lipídios e no metabolismo das lipoproteínas. A média de idade das mulheres do grupo 2 foi discretamente maior que as do grupo 1, na magnitude de 3 anos, o que do ponto de vista clínico não deve alterar os resultados. O fato de não haver diferenças entre os dois grupos em todos os parâmetros avaliados, descarta o papel da menopausa como fator capaz de alterar os resultados.

Demonstra-se que, não apenas a concentração no plasma da HDL, mas também os aspectos qualitativos e funcionais desta lipoproteína são importantes e responsáveis por suas ações antiaterogênicas (Tall, 1995; Barter e Rye, 2006). Assim, a população de portadores de HDL que contenha a variante de apo A-I, denominada de mutação Milano da apo A-I, é protegida de eventos cardiovasculares, apesar dos níveis baixos de HDL circulantes. Por outro lado, indivíduos com níveis elevados de HDL fisiologicamente menos

efetivas, podem ser menos protegidos do que aqueles com níveis adequados de HDL metabolicamente mais adequadas (Norata et al., 2006).

A troca lipídica entre as partículas é uma parte crucial do transporte reverso do colesterol, requerendo regulação coordenada entre as subclasses de HDL (Lewis e Rader, 2005). Recentemente, mudanças na distribuição entre as subclasses de HDL foram intimamente relacionadas com a aterosclerose, superando inclusive as baixas concentrações de HDL (Barter e Rye, 2006). Alguns estudos demonstraram que partículas de HDL menores contribuem mais para o aumento do risco de DCV, enquanto as maiores partículas são associadas à diminuição de risco (Johansson et al., 1991; Syvanne et al., 1995; Jia et al., 2006).

A habilidade de receber lípidos é uma propriedade fundamental da HDL, visto que o metabolismo e a função desta lipoproteína no transporte reverso do colesterol dependem das trocas lipídicas (Cheung et al., 1999; Ansell et al., 2005, Jiang et al. 2006).

Em nossa investigação, não ocorreu alteração no tamanho da partícula de HDL entre os grupos 1 e 2, sugerindo ausência de efeito da menopausa sobre o tamanho da partícula da HDL, o que implica em que a menopausa em si não modifica o perfil das subclasses de HDL. Ushiroyama et al. (2005) e Stevenson et al.(1993) registraram diminuição da HDL₂ e aumento da HDL₃ no período de pré para a pós-menopausa, porém, esse resultado pode ser consequência dos níveis elevados de triglicérides presentes nas participantes

do grupo na pós-menopausa, o que pode ter afetado de forma significativa a fração HDL.

O tamanho das partículas é um reflexo indireto de suas funções anti-aterogênicas, visto que são modificadas por aquisição ou perda de conteúdo lipídico ou protéico. Ikenoue et al. (1999) demonstraram redução no tamanho das partículas de LDL na pós-menopausa o que as torna mais aterogênicas. Berg et al. (2001) comprovaram aumento na atividade da lipase hepática o que eleva a aterogenicidade na pós-menopausa por modificar a distribuição das subclasses das lipoproteínas.

Em nosso estudo, não se observaram alterações nas concentrações e nem no tamanho das partículas de HDL entre os grupos. O crescente interesse no estudo do tamanho e na composição das partículas de lipoproteínas tem levado ao desenvolvimento de inúmeras técnicas com esse objetivo, sendo que em nossa investigação, utilizou-se novo método para avaliar o tamanho das partículas de HDL, que foi o espalhamento de luz laser, empregado anteriormente por Lima e Maranhão (2004) para a medida do tamanho da HDL e por outros autores para medir o diâmetro da LDL (O'Neal et al., 1998). Essa técnica é simples, prática e de baixo custo, o que a torna método exeqüível na prática clínica.

Maranhão et al. (1994) desenvolveram técnicas de grande praticidade para medir a capacidade da HDL em receber colesterol de outras lipoproteínas, utilizando um modelo artificial de LDL, o que facilita a avaliação funcional destas lipoproteínas.

O comportamento do tamanho da HDL frente ao metabolismo lipídico alterado em mulheres na pós-menopausa ainda não é bem compreendido (Zhang et al., 2001; Yang et al., 2005).

A proteção contra DAC na mulher parece estar relacionada a aspectos funcionais desta lipoproteína. A produção, o remodelamento e a remoção das lipoproteínas é um processo dinâmico, mediado por muitos fatores, como enzimas, proteínas de transferência e apolipoproteínas (Pascot et al., 2002). A composição lipídica, o conteúdo dietético e os níveis hormonais podem influenciar estes fatores e os mecanismos através dos quais eles afetam o metabolismo lipídico (Williams et al., 1993; Rader, 2006). Novos estudos nessa mesma linha de pesquisa poderão contribuir para melhor compreensão desses aspectos.

7. Conclusões

A menopausa não influenciou:

1. O tamanho das partículas da HDL utilizando o espalhamento de luz laser.
2. A capacidade da HDL em receber colesterol livre, éster de colesterol, fosfolipídios e triglicérides da nanoemulsão contendo LDE.

8. ANEXOS

Anexo A

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, APROVA, em referência, o Protocolo de Pesquisa nº 404/04, intitulada "Eficácia do estresse em intervenções sobre o sistema de perfusão do HCL e da capacidade de Lignocetina do capter ventricular", apresentado pelo Departamento GASTROENTEROLOGIA E GINECOLOGIA, incluindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Investigador(a) Responsável: Prof. Dr. Wilson Roberto de Melo

Pesquisador(a) Executor: Dra. Andréa Helena de Vito Gribina

CAPPesq, 02 de Agosto de 2004.

 PROF. DR. ELACIDES ALVES DE CASTRO
 Presidente da Comissão Ética para Análise
 de Projetos de Pesquisa

COMENTÁRIO: Este documento elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Protocolo de Pesquisa) de Ginecologia e Obstetrícia nº 404, de 2004, sendo 2004, item "b".

Anexo B

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PACIENTE :
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ? F ?
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE: (.....).....
 2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ? F ?
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Influência do advento da menopausa sobre o tamanho das partículas de HDL e sobre a capacidade da lipoproteína de captar colesterol
2. PESQUISADOR: Aricia Helena Giribela.
 CARGO/FUNÇÃO: Médica Pós-Graduada da Clínica Ginecológica HC-FMUSP
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 87067.
 UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Ginecológica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	?	RISCO MÍNIMO	? X	RISCO MÉDIO	?
RISCO BAIXO	?	RISCO MAIOR	?		

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : outubro de 2004 a outubro de 2005.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

A. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

O controle dos níveis de colesterol da pressão alta e diabetes são fundamentais para a prevenção e tratamento de doenças do coração. A senhora vai ser submetida a um exame que procura avaliar se houve alteração no funcionamento do colesterol antes e depois da menopausa (parada da menstruação), tentando mostrar se há algum papel da menopausa como fator de piora ou melhora destes riscos. Estudos anteriores mostraram que o colesterol tem importante papel na doença do coração, ele é formado de partes, sendo conhecidas como LDL (mau colesterol), HDL (bom colesterol), a distribuição destas partes assim como o valor total do colesterol tem importante papel no aparecimento e prevenção de doenças como : derrame, trombose, e principalmente infarto. Sabemos também por estudos anteriores que as mulheres sofrem mais tarde que os homens de problemas cardiovasculares, possivelmente isso ocorre pela presença dos hormônios femininos antes da ,menopausa. O objetivo deste estudo é avaliar os níveis de colesterol e distribuição de suas partes formadoras antes e depois da menopausa. Este estudo será realizado no Ambulatório de Ginecologia do HC-FMUSP. O Dr Nilson Roberto de Melo é o médico responsável por este projeto. Portanto qualquer dúvida pode ser discutida com o Dr. Nilson.

B. Procedimentos :

Se você concordar em participar do estudo vai acontecer o seguinte:

1. Em primeiro lugar um história médica (consulta) e exame físico serão realizados. Para participar do estudo você deve ter idade entre 40 a 54 anos e não deve usar reposição hormonal ou anticoncepcionais hormonais, não deve ter aumento do nível do colesterol, diabetes, doenças do coração, infarto, derrame ou trombose antes do início da pesquisa.
 2. Se você decidir participar desta pesquisa deverá assinar termo de consentimento.
 3. Em duas ocasiões deverá comparecer ao ambulatório da ginecologia para realizar testes sanguíneos e exames de rotina que mostram sua saúde. Serão colhidos 20 ml (6 colheres de sopa) de sangue venoso, através de punção de veia do braço que será utilizado para dosagens de colesterol total e frações, glicemia, TSH, LH, FSH. Serão realizados ultra-som transvaginal e mamografia.
- C. Duração do Estudo: O estudo terá duração de 1 ano. Durante o estudo você deverá vir ao hospital 2 vezes. Sendo que na primeira será para o exame médico e exames de sangue. Caso você seja selecionado para o estudo, na segunda visita você verá os resultados dos exames e colherá novamente 20 ml de sangue da veia do braço.
- D. Riscos e Desconfortos: Punção Venosa: a sua veia será puncionada pelo menos 2 vezes durante o estudo. A punção venosa pode resultar em pequenos hematomas(manchas azuladas na pele) que desaparecem espontaneamente após aproximadamente 1 semana. Em alguns casos pode ocorrer discreta irritação no local que também desaparece espontaneamente.
- E. Benefícios: espera-se que a informação resultante deste estudo vá ajudar os pesquisadores a saber se a menopausa tem efeito agressor ou se os hormônios femininos tem efeito protetor para as doenças cardiovasculares e se há formas de identificar as mulheres de maior risco e fazer algo para evitar doenças decorrentes disso.

F. Custos: Nenhum dos procedimentos serão cobrados de você

G. Compensação: este estudo depende de participação voluntária, portanto você não receberá nenhuma compensação por participar do estudo. Porém serão fornecidos lanches e vale transporte durante sua visita ao hospital.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Nilson Roberto de Melo

Arcia Giribela

AV. Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 44

Tel ; 30695054

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador (carimbo ou
nome Legível)

Anexo C

Tabela C1.

Iniciais dos nomes, idade, peso, altura, IMC, glicemia e FSH das mulheres do

Grupo 1

Grupo1										
N	Iniciais	RGHC	Idade (anos)	Tempo Menopausa (anos)	Peso (kg)	Alt (m)	CA (cm)	IMC (kg/m ²)	Glic (mg/dl)	FSH (UI/L)
1	EFL	5214592c	43	0	55,7	1,61	66	21,5	81	2,1
2	NLT	2557810c	43	0	54,0	1,48	82	25,1	87	7,5
3	MAS	3358056g	46	0	59,0	1,58	78	23,6	80	4,0
4	MCP	3341664a	45	0	62,0	1,68	84	22,0	83	0,9
5	RMSA	2376378d	41	0	66,0	1,5	95	29,3	87	7,0
6	VLCV	13442060f	47	0	50,0	1,56	74	20,6	88	4,3
7	MCS	2953780k	43	0	74,0	1,68	93	26,2	100	7,5
8	LFF	13637314e	46	0	59,0	1,52	90	25,5	87	7,5
9	MNBM	2206902a	51	0	55,0	1,5	80	24,4	107	29,0
10	MRBE	4042468b	44	0	70,0	1,6	85	27,3	78	5,7
11	AHS	3308573c	41	0	71,4	1,67	89	25,6	80	3,3
12	JMS	2957500a	50	0	62,0	1,54	78	26,1	107	4,9
13	MSP	13480873i	44	0	52,4	1,5	59	23,3	76	8,0
14	MB	2570529d	48	0	76,0	1,69	75	26,6	74	28,0
15	HSP	2827486k	45	0	55,0	1,6	60	21,5	78	4,1
16	MAF	13440243k	48	0	70,0	1,58	98	28,0	93	2,0
17	EAN	2815741j	41	0	60,0	1,55	78	25,0	89	2,9
18	MJS	13537611c	46	0	63,0	1,55	93	26,2	82	24,5
19	OSA	2961807f	42	0	53,0	1,5	79	23,0	86	3,3
20	EFMS	13475728d	48	0	48,0	1,5	76	21,3	81	29,0
21	CAS	3013906a	48	0	70,0	1,53	85	30,0	81	14,0
22	RGAS	13595713d	41	0	68,4	1,59	86	26,0	78	2,7
Média			45,05		61,54	1,57	81,0	24,92	85,59	9,20
Desv-p			3,02		8,20	0,07	10,4	2,60	9,12	9,50

Tabela C2.

Iniciais dos nomes, idade, peso, altura, IMC, glicemia e FSH das mulheres do

Grupo 2

Grupo2										
N	Inicias	RGHC	Idade (anos)	Tempo Menopausa (anos)	Peso (kg)	Alt (cm)	CA (cm)	IMC (kg/m²)	Glic (mg/dl)	FSH (UI/L)
1	ECR	13469943c	49	3	67	1,67	92	24,0	84	87,8
2	MSOS	3285103c	48	1	50	1,65	72	18,4	77	63,5
3	EMA	13440790a	49	2	64	1,59	87	25,3	94	62,6
4	ISC	3278017b	52	2	71	1,59	88	28,1	99	108,7
5	IBMP	13481764j	46	1	59	1,63	79	22,2	91	92,0
6	FVS	3010204b	51	5	60	1,60	67	23,4	85	75,0
7	IMD	13485112i	49	2	60	1,50	90	26,7	89	54,0
8	LOL	13611058j	47	1	53	1,61	80	20,4	82	88,0
9	MGC	13635860f	51	9	53	1,52	72	22,9	93	59,3
10	ARS	3188725g	53	5	55	1,53	80	23,5	81	103,0
11	GQNF	3200678h	49	3	73	1,55	98	30,4	93	64,0
12	MCA	3041223g	46	1	62	1,58	78	24,8	87	96,0
13	AOC	4943947f	40	3	84	1,70	95	29,1	77	60,0
14	RSP	2213545k	46	3	64	1,58	84	25,6	88	44,9
15	EML	2051700i	50	2	65	1,70	77	22,5	77	54,0
16	CFG	3083780d	51	7	70	1,67	87	25,1	92	57,0
17	MAC	2052811a	48	3	65	1,58	89	26,0	79	48,0
18	MGS	13704507a	44	2	61	1,62	80	23,0	79	60,0
Média			48,28	3,1	63,1	1,60	83,0	24,53	85,54	71,00
Desv-p			3,14	2,2	8,2	0,06	8,3	2,95	6,83	19,80

Anexo D

Tabela D1

Perfil lipídico e apolipoproteínas do Grupo 1

Grupo1	N	Iniciais	RGHC	TG (mg/dl)	Col (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	VLDL (mg/dl)	Apo A1 (g/l)	Apo B (g/l)
	1	EFL	5214592c	67	207	83	115	9	1,61	0,64
	2	NLT	2557810c	60	182	85	85	12	2,37	0,98
	3	MAS	3358056g	73	175	75	85	15	1,28	0,61
	4	MCP	3341664a	124	202	58	119	25	1,38	0,97
	5	RMSA	2376378d	110	163	59	82	22	1,65	0,56
	6	VLCV	13442060f	69	186	69	53	119	1,55	0,97
	7	MCS	2953780k	126	201	57	139	25	1,87	1,21
	8	LFF	13637314e	165	208	43	122	43	1,64	1,21
	9	MNBM	2206902a	174	178	46	97	35	1,54	1,05
	10	MRBE	4042468b	103	194	59	11	21	1,61	0,87
	11	AHS	3308573c	185	203	58	108	37	1,63	0,89
	12	JMS	2957500a	68	173	67	68	14	1,25	0,55
	13	MSP	13480873i	59	134	45	77	12	1,16	0,55
	14	MB	2570529d	81	213	56	141	16	1,45	0,87
	15	HSP	2827486k	73	210	65	142	12	1,54	0,97
	16	MAF	13440243k	150	205	42	122	41	1,25	1,14
	17	EAN	2815741j	64	193	73	107	13	1,54	0,70
	18	MJS	13537611c	80	126	42	68	16	1,46	0,86
	19	OSA	2961807f	86	193	75	105	14	1,5	1,00
	20	EFMS	13475728d	46	182	67	132	9	1,54	1,00
	21	CAS	3013906a	69	204	67	143	14	1,82	1,15
	22	RGAS	13595713d	118	211	58	158	24	1,78	1,29
Média				97,73	188,32	61,32	103,59	24,91	1,56	0,91
Desv-p				40,79	23,48	12,70	35,26	23,37	0,26	0,23

Tabela D2

Perfil lipídico e apolipoproteínas do Grupo 2

Grupo2	N	Iniciais	RGHC	TG (mg/dl)	Col (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	VLDL (mg/dl)	Apo A1 (g/l)	Apo B (g/l)
	1	ECR	13469943c	46	148	55	67	26	1,64	0,63
	2	MSOS	3285103c	56	171	62	98	11	1,47	0,92
	3	EMA	13440790a	64	141	53	78	10	1,43	0,72
	4	ISC	3278017b	69	201	55	129	17	1,65	1,24
	5	IBMP	13481764j	104	161	45	95	21	1,32	0,87
	6	FVS	3010204b	92	183	76	89	18	1,75	0,58
	7	IMD	13485112i	115	211	58	141	23	1,88	1,18
	8	LOL	13611058j	73	170	78	77	15	1,76	0,71
	9	MGC	13635860f	66	182	55	124	13	1,46	0,87
	10	ARS	3188725g	76	192	55	122	15	1,45	0,89
	11	GQNF	3200678h	155	181	31	104	46	1,09	1,03
	12	MCA	3041223g	60	189	86	91	12	1,83	0,66
	13	AOC	4943947f	60	150	65	93	12	1,59	0,67
	14	RSP	2213545k	48	209	71	128	10	1,62	0,89
	15	EML	2051700i	50	135	65	60	10	1,21	0,48
	16	CFG	3083780d	84	211	58	136	17	1,31	0,7
	17	MAC	2052811a	67	182	85	85	12	1,28	0,61
	18	MGS	13704507a	155	178	46	97	35	1,54	0,95
Média				80,0	177,5	61,06	100,78	17,94	1,52	0,81
Desv-p				32,97	23,45	14,26	24,11	9,59	0,22	0,21

Anexo E

Tabela E1

Tamanho da partícula de HDL e transferência de lipídios no Grupo 1

Grupo1											
N	Iniciais	RGHC	HDL (nm)	%-CE	%-PL	%-TG	%CL	T-CE	T-PL	T-TG	T-CL
1	EFL	5214592c	9,4	1,5	20,1	3,4	6,1	0,2	2,4	0,4	0,7
2	NLT	2557810c	8,3	1,6	16,5	2,0	5,0	0,2	1,9	0,2	0,6
3	MAS	3358056g	8,6	4,5	15,5	4,1	7,5	0,6	2,1	0,6	1,0
4	MCP	3341664a	9,1	3,5	15,4	4,6	6,6	0,6	2,7	0,8	1,1
5	RMSA	2376378d	8,8	5,8	13,0	3,6	7,0	1,0	2,2	0,6	1,2
6	VLCV	13442060f	9,2	1,8	17,6	3,5	4,4	0,3	2,6	0,5	0,6
7	MCS	2953780k	9,3	2,3	17,8	4,5	5,7	0,4	3,1	0,8	1,0
8	LFF	13637314e	9,1	1,4	16,9	3,9	4,6	0,3	3,9	0,9	1,1
9	MNBM	2206902a	9,4	3,1	17,3	3,7	4,7	0,7	3,8	0,8	1,0
10	MRBE	4042468b	8,6	2,4	19,0	4,2	5,9	0,4	3,2	0,7	1,0
11	AHS	3308573c	8,7	3,1	18,4	2,5	5,7	0,5	3,2	0,4	1,0
12	JMS	2957500a	10,1	1,5	17,0	3,7	5,4	0,2	2,5	0,5	0,8
13	MSP	13480873i	8,1	1,1	15,8	3,8	4,4	0,2	3,5	0,8	1,0
14	MB	2570529d	9,3	3,6	17,3	3,3	4,6	0,6	3,1	0,6	0,8
15	HSP	2827486k	9,1	3,0	19,8	3,6	4,8	0,5	3,0	0,6	0,7
16	MAF	13440243k	9,6	3,7	19,8	3,8	5,3	0,9	4,7	0,9	1,3
17	EAN	2815741j	8,9	3,9	17,7	3,4	5,8	0,5	2,4	0,5	0,8
18	MJS	13537611c	8,9	2,7	16,3	3,6	4,9	0,7	3,9	0,9	1,2
19	OSA	2961807f	8,7	8,5	17,0	2,5	6,1	1,1	2,3	0,3	0,8
20	EFMS	13475728d	9,2	3,0	22,0	3,0	6,3	0,4	3,3	0,4	0,9
21	CAS	3013906a	7,8	3,1	21,1	3,8	6,1	0,5	3,1	0,6	0,9
22	RGAS	13595713d	9,0	2,8	20,2	5,3	5,4	0,5	3,5	0,9	0,9
Média			8,96	3,1	17,79	3,64	5,6	0,5	3,0	0,6	0,9
Desv-p			0,51	1,7	2,11	0,72	0,9	0,3	0,7	0,2	0,2

Tabela E2

Tamanho da partícula de HDL e transferência de lipídios no Grupo 2

Grupo2											
N	Iniciais	RGHC	HDL(nm)	%-CE	%-PL	%-TG	%-CL	T-CE	T-PL	T-TG	T-CL
1	ECR	13469943c	8,0	3,2	20,9	3,1	5,1	0,6	3,8	0,6	0,9
2	MSOS	3285103c	8,1	2,9	18,9	2,6	4,9	0,5	3,0	0,4	0,8
3	EMA	13440790a	8,0	2,1	18,8	3,3	5,0	0,4	3,5	0,6	0,9
4	ISC	3278017b	8,4	2,3	19,0	2,4	4,9	0,4	3,5	0,4	0,9
5	IBMP	13481764j	8,5	1,0	17,2	2,1	4,5	0,2	3,8	0,5	1,0
6	FVS	3010204b	9,4	2,6	15,4	4,2	7,6	0,3	2,0	0,6	1,0
7	IMD	13485112i	10,7	1,8	18,3	4,4	5,3	0,3	3,2	0,8	0,9
8	LOL	13611058j	9,5	1,3	16,5	3,7	5,5	0,2	2,1	0,5	0,7
9	MGC	13635860f	9,0	2,3	18,0	4,3	4,9	0,4	3,3	0,8	0,9
10	ARS	3188725g	8,8	3,3	20,8	4,5	5,6	0,6	3,8	0,8	1,0
11	GQNF	3200678h	10,0	3,6	19,4	3,5	4,4	1,2	6,2	1,1	1,4
12	MCA	3041223g	8,3	4,1	19,5	4,7	6,9	0,5	2,3	0,5	0,8
13	AOC	4943947f	8,9	2,5	15,0	2,5	4,8	0,4	2,3	0,4	0,7
14	RSP	2213545k	9,5	3,4	20,3	4,3	4,4	0,5	2,9	0,6	0,6
15	EML	2051700i	8,4	2,7	17,8	3,6	4,7	0,4	2,7	0,5	0,7
16	CFG	3083780d	7,9	3,6	21,7	2,7	5,8	0,6	3,7	0,5	1,0
17	MAC	2052811a	8,3	2,6	21,3	3,0	5,4	0,3	2,5	0,4	0,6
18	MGS	13704507a	8,8	2,8	20,2	5,3	5,4	0,6	4,4	1,2	1,2
Média			8,81	2,7	18,83	3,57	5,3	0,5	3,3	0,6	0,9
Desv-p			0,76	0,8	1,95	0,92	0,8	0,2	1,0	0,2	0,2

9. Referências Bibliográficas

1. Abbey M, Owen A, Suzakawa M, Roach P, Nestel PJ. Effects of menopause and hormone replacement therapy on plasma lipids, lipoproteins and LDL-receptor activity. *Maturitas* 1999;33:259-69.
2. Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1792-8.
3. Asztalos BF. High-density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL Atherosclerosis Treatment Study. *Curr Opin Cardiol* 2004;19:385-91.
4. Barter PJ. Hugh sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors. *Atheroscler Suppl* 2002;3:39-47.
5. Barter PJ, Kastelein JJ. Targeting cholesteryl ester transfer protein for the prevention and management of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:492-9.
6. Barter PJ, Rye KA. Relationship between the concentration and antiatherogenic activity of high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:399-403.
7. Bass KM, Newschaffer CJ, Klag MJ, Bush TL. Plasma lipoprotein levels as predictors of cardiovascular death in women. *Arch Intern Med* 1993;153:2209-16.

8. Berg GA, Siseles N, Gonzalez AI, Ortiz OC, Tempone A, Wikinski RW. Higher values of hepatic lipase activity in postmenopause: relationship with atherogenic intermediate density and low density lipoproteins. *Menopause* 2001;8:51-7.
9. Berg GA, Schreier L, Wikinski RW. Perfil lipídico y síndrome metabólico en la menopausia. Efectos de la terapia hormonal de reemplazo. In: Siseles N. *Información y formación para el manejo actual de la mujer en su climaterio*. Buenos Aires: Ascune Hnos.; 2005. p. 281-292.
10. Bittner V. Women and coronary heart disease risk factors. *J Cardiovasc Risk* 2002;9:315-22.
11. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV. Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1981;665:408-19.
12. Carr MC, Ayyobi AF, Murdoch SJ, Deeb SS, Brunzell JD. Contribution of hepatic lipase, lipoprotein lipase, and cholesteryl ester transfer protein to LDL and HDL heterogeneity in healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:667-73.
13. Castelli WP, Anderson K, Wilson PW, Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Epidemiol* 1992;2:23-8.
14. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *Jama* 1986;256:2835-8.

15. Chan DC, Watts GF, Barrett PH, O'Neill FH, Thompson GR. Plasma markers of cholesterol homeostasis and apolipoprotein B-100 kinetics in the metabolic syndrome. *Obes Res* 2003;11:591-6.
16. Cheung MC, Wolfbauer G, Brown BG, Albers JJ. Relationship between plasma phospholipid transfer protein activity and HDL subclasses among patients with low HDL and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1999;142:201-5.
17. Datasus/MS. Óbitos por ocorrência e por causa, Brasil e Unidades da Federação, ano 2002. Faixa etária: 40-59 anos. Sexo feminino. Sistema de informações sobre mortalidade. Mortalidade proporcional por grupos de causas. 2002, 10p. www.tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe
18. Davis CE, Pajak A, Rywik S, Williams DH, Broda G, Pazucha T, Ephross S. Natural menopause and cardiovascular disease risk factors. The Poland and US Collaborative Study on Cardiovascular Disease Epidemiology. *Ann Epidemiol* 1994;4:445-8.
19. De Oliveira e Silva ER, Kong M, Han Z, Starr C, Kass EM, Juo SH, Foster D, Dansky HM, Merkel M, Cundey K, Brinton EA, Breslow JL, Smith JD. Metabolic and genetic determinants of HDL metabolism and hepatic lipase activity in normolipidemic females. *J Lipid Res* 1999;40:1211-21.
20. Dressler WW, Santos JE. Social and cultural dimensions of hypertension in Brazil: a review. *Cad Saude Publica* 2000;16:303-15.

21. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1984;25:1017-58.
22. Fredenrich A, Bayer P. Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab* 2003;29:201-5.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
24. Fukami K, Koike K, Hirota K, Yoshikawa H, Miyake A. Perimenopausal changes in serum lipids and lipoproteins: a 7-year longitudinal study. *Maturitas* 1995;22:193-7.
25. Genest J, Jr. Emerging risk factors associated with cardiovascular diseases. *Can J Cardiol* 1999;15 Suppl G:73G-6G.
26. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968;9:155-67.
27. Gordon T, Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM. Menopause and coronary heart disease. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1978;89:157-61.
28. Gracia CR, Sammel MD, Freeman EW, Lin H, Langan E, Kapoor S, Nelson DB. Defining menopause status: creation of a new definition to identify the early changes of the menopausal transition. *Menopause* 2005;12:128-35.

29. Guthrie JR, Taffe JR, Lehert P, Burger HG, Dennerstein L. Association between hormonal changes at menopause and the risk of a coronary event: a longitudinal study. *Menopause* 2004;11:315-22.
30. Harris SB, Lank CN. Recommendations from the Canadian Diabetes Association. 2003 guidelines for prevention and management of diabetes and related cardiovascular risk factors. *Can Fam Physician* 2004;50:425-33.
31. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996;3:213-9.
32. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Grodstein F, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC. Trends in the incidence of coronary heart disease and changes in diet and lifestyle in women. *N Engl J Med* 2000;343:530-7.
33. Ikenoue N, Wakatsuki A, Okatani Y. Small low-density lipoprotein particles in women with natural or surgically induced menopause. *Obstet Gynecol* 1999;93:566-70.
34. Jia L, Long S, Fu M, Yan B, Tian Y, Xu Y, Gou L. Relationship between total cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol ratio, triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio, and high-density lipoprotein subclasses. *Metabolism* 2006;55:1141-8.
35. Jiang XC, Zhou HW. Plasma lipid transfer proteins. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:302-8.

36. Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb* 1991;11:174-82.
37. Johnson CL, Rifkind BM, Sempos CT, Carroll MD, Bachorik PS, Briefel RR, Gordon DJ, Burt VL, Brown CD, Lippel K, et al. Declining serum total cholesterol levels among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys. *Jama* 1993;269:3002-8.
38. Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 1976;85:447-52.
39. Kannel WB, Levy D. Menopause, hormones, and cardiovascular vulnerability in women. *Arch Intern Med* 2004;164:479-81.
40. Kannel WB, Wilson PW. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med* 1995;155:57-61.
41. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3:144-53.
42. Kopelman PG. Investigation of obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994;41:703-8.
43. Lauritzen C. Basic facts and definitions. In: Lauritzen C, Studd J. Current management of the menopause. United Kingdom: Taylor e Francis;2005.3-8.

44. Legato MJ. Dyslipidemia, gender, and the role of high-density lipoprotein cholesterol: implications for therapy. *Am J Cardiol* 2000;86:15L-18L.
45. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005;96:1221-32.
46. Li Z, McNamara JR, Fruchart JC, Luc G, Bard JM, Ordovas JM, Wilson PW, Schaefer EJ. Effects of gender and menopausal status on plasma lipoprotein subspecies and particle sizes. *J Lipid Res* 1996;37:1886-96.
47. Lima ES, Maranhao RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem* 2004;50:1086-8.
48. Lima ES, Couto RD. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42: 169-78.
49. Lotufo PA, Bensenor IM. Trends of stroke subtypes mortality in Sao Paulo, Brazil (1996-2003). *Arq Neuropsiquiatr* 2005;63:951-5.
50. Maas AH, van der Schouw YT, Grobbee DE, van der Graaf Y. Rise and fall of hormone therapy in postmenopausal women with cardiovascular disease. *Menopause* 2004;11:228-35.
51. Maranhao RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SM, Coelho IJ, Meneghetti JC, Pileggi FJ, Chamone DA. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res* 1994;54:4660-6.
52. Marmillot P, Patel S, Lakshman MR. Reverse cholesterol transport is regulated by varying fatty acyl chain saturation and sphingomyelin

content in reconstituted high-density lipoproteins. *Metabolism* 2007;56:251-9.

53. Matthan NR, Jalbert SM, Lamon-Fava S, Dolnikowski GG, Welty FK, Barrett HR, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. TRL, IDL, and LDL apolipoprotein B-100 and HDL apolipoprotein A-I kinetics as a function of age and menopausal status. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1691-6.
54. Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, Kelsey SF, Caggiula AW, Wing RR. Menopause and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* 1989;321:641-6.
55. Melo NR. Efeito da terapêutica estrogênica transdérmica associada ao progestagênio oral sobre o perfil lipídico e a remoção plasmática de uma emulsão rica em colesterol[tese livre docência.São Paulo: Faculdade de Medicina , Universidade de São Paulo;1999.]
56. Mercurio G, Zoncu S, Dragoni F. Gender differences in cardiovascular risk factors. *Ital Heart J* 2003;4:363-6.
57. Mosca L, Appel LJ, Benjamin EJ, Berra K, Chandra-Strobos N, Fabumni RP, Grady D, Haan CK, Hayes SN, Judelson DR, Keenan NL, McBride P, Oparil S, Ouyang P, Oz MC, Mendelsohn ME, Pasternak RC, Pinn VW, Robertson RM, Schenck-Gustafsson K, Sila CA, Smith SC, Jr., Sopko G, Taylor AL, Walsh BW, Wenger NK, Williams CL. Summary of the American Heart Association's evidence-based guidelines for

cardiovascular disease prevention in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 a;24:394-6.

58. Mosca L, Appel LJ, Benjamin EJ, Berra K, Chandra-Strobos N, Fabunmi RP, Grady D, Haan CK, Hayes SN, Judelson DR, Keenan NL, McBride P, Oparil S, Ouyang P, Oz MC, Mendelsohn ME, Pasternak RC, Pinn VW, Robertson RM, Schenck-Gustafsson K, Sila CA, Smith SC, Jr., Sopko G, Taylor AL, Walsh BW, Wenger NK, Williams CL. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women. American Heart Association scientific statement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 b;24:e29-50.
59. Nerbrand C, Lidfeldt J, Nyberg P, Schersten B, Samsioe G. Serum lipids and lipoproteins in relation to endogenous and exogenous female sex steroids and age. The Women's Health in the Lund Area (WHILA) study. *Maturitas* 2004;48:161-9.
60. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;16:371-86.
61. O'Brien T, Nguyen TT. Lipids and lipoproteins in women. *Mayo Clin Proc* 1997;72:235-44.
62. O'Neal D, Harrip P, Dragicevic G, Rae D, Best JD. A comparison of LDL size determination using gradient gel electrophoresis and light-scattering methods. *J Lipid Res* 1998;39:2086-90.

63. Parks EJ. Recent findings in the study of postprandial lipemia. *Curr Atheroscler Rep* 2001;3:462-70.
64. Pascot A, Lemieux I, Bergeron J, Tremblay A, Nadeau A, Prud'homme D, Couillard C, Lamarche B, Despres JP. HDL particle size: a marker of the gender difference in the metabolic risk profile. *Atherosclerosis* 2002;160:399-406.
65. Peters HW, Westendorp IC, Hak AE, Grobbee DE, Stehouwer CD, Hofman A, Witteman JC. Menopausal status and risk factors for cardiovascular disease. *J Intern Med* 1999;246:521-8.
66. Poehlman ET, Toth MJ, Ades PA, Rosen CJ. Menopause-associated changes in plasma lipids, insulin-like growth factor I and blood pressure: a longitudinal study. *Eur J Clin Invest* 1997;27:322-6.
67. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006;116:3090-100.
68. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. Duxbury Press, 4^a edição New York, 1994; 682-90.
69. Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999;145:227-38.
70. Santos RD, Sposito AC, dos Santos JE, Fonseca FH, Moriguchi EH, Martinez TL, Armaganijam D, Timerman S, Timerman A, Nicolau JC, Ramires JA. PANDORA - Survey of Brazilian cardiologists about cholesterol reduction. *Arq Bras Cardiol* 2000;75:289-302.

71. Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, Woods N. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Climacteric* 2001;4:267-72.
72. Stevenson JC, Crook D, Godsland IF. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. *Atherosclerosis* 1993;98:83-90.
73. Syvanne M, Ahola M, Lahdenpera S, Kahri J, Kuusi T, Virtanen KS, Taskinen MR. High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Lipid Res* 1995;36:573-82.
74. Tailleux A, Fruchart JC. HDL heterogeneity and atherosclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996;33:163-201.
75. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies. *J Intern Med* 1995;237:5-12.
76. The North American Menopause Society. Clinical challenges of perimenopause: consensus opinion of The North American Menopause Society. *Menopause* 2000;7:5-13.
77. The North American Menopause Society. Estrogen and progestogen use in peri- and postmenopausal women: March 2007 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*;2007;14:168-82.

78. Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3106-10.
79. Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:1143-58.
80. Ushiroyama T, Sakuma K, Ikeda A, Ueki M. The HDL2/HDL3 ratio in menopause. *Int J Gynaecol Obstet* 2005;88:303-8.
81. von Eckardstein A, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8:147-52.
82. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13-27.
83. Wang M, Briggs MR. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem Rev* 2004;104:119-37.
84. Welty FK. Women and cardiovascular risk. *Am J Cardiol* 2001;88:48J-52J.
85. Whitworth JA, Chalmers J. World health organisation-international society of hypertension (WHO/ISH) hypertension guidelines. *Clin Exp Hypertens* 2004;26:747-52.
86. World Health Organization. Research on the Menopause in the 1990s: Report of a WHO Scientific Group. Geneva: World Health Organization;1996: 12–14. WHO Technical Report Series No. 866.

87. Williams GZ. Serum lipid values and age in healthy women: a preliminary report on cholesterol. *Methods Inf Med* 1993;32:219-21.
88. Wu ZY, Wu XK, Zhang YW. Relationship of menopausal status and sex hormones to serum lipids and blood pressure. *Int J Epidemiol* 1990;19:297-302.
89. Yang Y, Yan B, Fu M, Xu Y, Tian Y. Relationship between plasma lipid concentrations and HDL subclasses. *Clin Chim Acta* 2005;354:49-58.
90. Zhang C, Zhuang Y, Qiang H, Liu X, Xu R, Wu Y. Relationship between endogenous estrogen concentrations and serum cholesteryl ester transfer protein concentrations in Chinese women. *Clin Chim Acta* 2001;314:77-83.