UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

EFEITO DA APOLIPOPROTEÍNA B NO METABOLISMO DE
EMULSÕES SEMELHANTES À FASE LIPÍDICA DA LDL,
EM RATOS

ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO HIRATA

Tese para obtenção do grau de
DOCTOR

Orientador:

Prof. Assoc. RAUL CAVALCANTE MARANHÃO

São Paulo

1991

12658

A DEUS

Defendidas: 24/11/91

A meus pais Jesus e Delia e irmãs Isabel e Marina
pelo amor, dedicação e exemplo de vida que
foram as bases da minha formação humana.

Ao meu esposo Mário pelo amor, carinho,
compreensão e estímulo e pela sua
valiosa contribuição na execução
deste trabalho

Aos meus filhos, Thiago e Felipe,
pelo amor, alegria e carinho
e pela paciência nos
momentos ausentes

Ao Prof. Assoc. Raul Cavalcante Maranhão,
pela amizade, orientação e apoio que
tornaram possível a realização
deste trabalho

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu Diretor, Prof. Tit. Franco Maria Lajolo;

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Profª Associada Marilene de Vuono Penteado;

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Prof. Tit. Paulo S. Minami;

Ao responsável pela Disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Prof. Tit. Bruno Strufaldi pela amizade, apoio constante e pelas sugestões;

Ao Prof. Assoc. Mario Hiroyuki Hirata da Disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo inestimável auxílio, valiosas sugestões, pelo incentivo e apoio constantes;

Aos colegas da disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Profa. Dra. Dulcinéia S.P. Abdalla, Profa. Dra. Ana Campa e Prof. Assist. Carlos A. Sannazzaro, pela amizade e constante apoio;

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique de Mesquita do IPEN/CNEN-SP pela concessão do uso de equipamento do seu laboratório, pela orientação na análise dos dados e estatística e pela amizade;

Ao Prof. Tit. Walter Terra e ao Prof. Tit. Giuseppe Cilento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela concessão do uso de equipamentos do seu laboratório;

Aos Farmacêuticos-Bioquímicos: Ricardo Omoto, Edson Luís da Silva, Marcia R. Melo e Maria Conceição M. Litrilha e ao acadêmico Edilberto P. de Oliveira pela colaboração na parte experimental deste trabalho e pela amizade;

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica Clínica, Maurício dos Santos, Paulo Roberto Omoto, Roberto Ferolla, Márcia M. Caetano, Sandra M. Dalberto pelo auxílio e amizade;

A Marieta F. Zacarias, Carmen L. M. Silva e Maria Dorlei M. de Oliveira cujo trabalho e dedicação na preparação dos materiais de laboratório nos permitiram um desempenho contínuo;

A Sofia de Fátima da Cruz, Maria Auxiliadora L. Souza, Sandra L. Penharbel, Maria Aparecida L. Nunes e Regina C. L. Silva pela amizade e dedicação;

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa da Disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Ivete de Araujo Roland, Thaís B. César, Suzana R. Pedroso, Marcia I. Otta, Jefferson Miara, Décio S. Barbosa, Marcia Cristina Teixeira, Carmem G.C.M. Vinagre, Sílvia M.S.C. Silva, Liliete C. Souza, Fernanda B. Araújo, Marcia Cristina Feres e Regina C. Silva, pelo incentivo e amizade sempre presentes;

à Silvana Neves, responsável pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela colaboração e fornecimento dos animais utilizados neste trabalho;

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, Moema P. Santos, Célia R. M. Fagotti, Rosângela J. Bellizia e Angelo J. Cruz, pela colaboração e amizade;

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo apoio, incentivo e amizade;

Aos professores e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo apoio e amizade;

Ao Sr. Raimundo G. da Silva pelos serviços gráficos;

à memória do inesquecível Vicente Feitosa;

A todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho;

Meus sinceros agradecimentos.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
SUMARIO Universidade de São Paulo

ABREVIATURAS	Pág. 1
INTRODUÇÃO	
1. Metabolismo das lipoproteínas	2
2. Captação celular das lipoproteínas	10
3. Apolipoproteína B	18
4. Modelos de emulsões artificiais	22
OBJETIVO	26
MATERIAIS E MÉTODOS	
1. Animais	27
2. Materiais	27
3. Métodos	28
3.1. Isolamento da apolipoproteína B de rato	28
3.2. Preparação das emulsões e associação com a apolipoproteína B	30
3.3. Obtenção da LDL de rato marcada isotopicamente ..	33
3.4. Métodos analíticos	36
3.5. Estudo da remoção plasmática das emulsões e LDL e sua distribuição em órgãos	37
3.6. Incubação das emulsões com a HDL de rato	40
3.7. Análise dos dados	41
3.8. Análise estatística	42
RESULTADOS	
1. Composição das emulsões	43
2. Remoção plasmática das emulsões	43
3. Captação das emulsões pelos órgãos	44
4. Tratamento com 17 α -etinil estradiol	45
5. Incubação das emulsões com HDL de rato	46
DISCUSSÃO	68
CONCLUSÕES	76
RESUMO	77
ABSTRACT	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ABREVIATURAS

ACAT	Acil coenzima A:colesterol aciltransferase
Apo	Apolipoproteína
Apo (a)	Apolipoproteína (a)
Apo A	Apolipoproteína A
Apo B	Apolipoproteína B
Apo C	Apolipoproteína C
Apo D	Apolipoproteína D
Apo E	Apolipoproteína E
β -VLDL	VLDL ricas em colesterol
CE	Éter oleico de colesterol
CETP	Proteína de transferência de ésteres de colesterol
CO	Oleato de colesterol
Coelhos WHHL	Coelhos Watanabe com hiperlipidemia hereditária
CT	Colesterol total
17-EE	17 α -etinil estradiol
EDTA sódico	Etilenodiaminotetracetato de sódio
FC	Fosfatidilcolina
FL	Fosfolipídeos
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL _e	HDL rica em apo E
HiperapoB	Hiperlipidemia por defeito genético da apo B
HL	Lipase hepática
HMGCoA redutase	3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LPL	Lipase lipoprotéica
LRP	Proteína relacionada com o receptor B,E
M _r	Massa molecular relativa
NaDC	Deoxicolato de sódio
NaN ₃	Azida sódica
PLTP	Proteína de transferência de fosfolipídeos
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TES	Ácido<N-tris[hidroximetil]metil-2-aminometano> sulfônico
TFR	Taxa fracional de remoção plasmática
TG	Triacilgliceróis
TGTP	Proteína de transferência de triacilgliceróis
TO	Trioleína
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

Observação:

Estas abreviaturas serão convenientemente empregadas em toda a extensão do trabalho.

INTRODUÇÃO

1. Metabolismo das lipoproteínas

As lipoproteínas são complexos macromoleculares formados por lipídeos e proteínas, sintetizadas principalmente pelo fígado e intestino e removidas da corrente sanguínea tanto pelo fígado quanto pelos tecidos extra-hepáticos^(99,134). Sua principal função fisiológica consiste no transporte plasmático dos lipídeos, oriundos da dieta ou produzidos endogenamente, tais como o colesterol e seus ésteres, os triacilgliceróis e os fosfolipídeos⁽⁵⁴⁾.

De um modo geral, as lipoproteínas plasmáticas são partículas esféricas, que apresentam um núcleo constituído de lipídeos apolares (ésteres de colesterol e triacilgliceróis) e uma camada superficial contendo lipídeos polares (fosfolipídeos e colesterol não esterificado) e proteínas⁽⁵⁴⁾.

Os componentes protéicos das lipoproteínas, as apolipoproteínas (apo), têm denominação alfanumérica: apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apo B-48, apo B-100; apo C-I, apo C-II, apo C-III; apo D, apo E e outras⁽⁷⁸⁾. As diversas apolipoproteínas têm peso molecular variando amplamente, desde 6,6 kDa (apo C-I) até 650 kDa [apo(a)]⁽⁷⁸⁾. As apolipoproteínas têm função estrutural e também participam como cofatores em reações enzimáticas no metabolismo das lipoproteínas ou na interação com receptores celulares^(48,78,101,121,168). A composição lipídica e as interações entre as moléculas de lipídeos e apolipoproteínas também são fatores importantes que influenciam

a via metabólica da partícula de lipoproteína e sua afinidade a um determinado receptor celular⁽⁹⁹⁻¹⁵²⁾.

As lipoproteínas plasmáticas são classificadas em cinco grandes classes: os quilomícrons ($d < 1,00$ g/mL), as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, $d < 1,006$ g/mL), as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL, $d = 1,006$ a $1,019$ g/mL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL, $d = 1,019$ a $1,063$ g/mL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL, $d = 1,063$ a $1,21$ g/mL). Cada classe compreende um grupo heterogêneo de partículas e apresenta propriedades físico-químicas e metabólicas distintas⁽¹¹⁻⁵⁴⁻¹³⁶⁾.

As células absortivas do intestino delgado sintetizam e secretam os quilomícrons. As VLDL são sintetizadas e secretadas pelos hepatócitos. As HDL originam-se tanto no fígado quanto no intestino.

Os quilomícrons, lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, são formados a partir dos lipídeos da dieta. Os quilomícrons recém-sintetizados são constituídos de triacilgliceróis (90%), fosfolipídeos (6 a 8%), ésteres de colesterol (1 a 2%), colesterol (1%) e apolipoproteínas (1 a 2%)⁽⁵⁴⁻¹³¹⁾. As apolipoproteínas compreendem a apo A-I (50%), a apo A-IV (21%), a apo B-48 (25%) e as apo Cs (4%)⁽¹⁷¹⁾. A apo B-48 é essencial para a síntese dos quilomícrons e posterior secreção na linfa mesentérica⁽¹³¹⁾.

As VLDL são lipoproteínas ricas em triacilgliceróis que transportam os lipídeos sintetizados no fígado para os tecidos extra-hepáticos. As VLDL são constituídas de

triacilgliceróis (50%), fosfolipídeos (19%), ésteres de colesterol (15%), colesterol (7%) e apolipoproteínas (9%)⁽⁵⁴⁾. Dessas apolipoproteínas, 50% são apo B-100, 46% são apo Cs e 4% são apo E⁽²⁴⁾. Os lipídeos das VLDL são sintetizados no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, sendo que o colesterol pode também originar-se da síntese de novo ou da degradação intracelular das lipoproteínas. As apolipoproteínas das VLDL são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e são associadas aos lipídeos no aparelho de Golgi⁽⁴³⁾. Após a síntese, essas apolipoproteínas sofrem glicosilação tanto no retículo endoplasmático quanto no aparelho de Golgi⁽⁴³⁾. A apo B-100 desempenha importante papel na estruturação das VLDL, no seu transporte intracelular e na sua liberação pelas células⁽⁷³⁾. As VLDL recém-sintetizadas são armazenadas em vesículas e posteriormente secretadas na circulação plasmática, onde sofrem uma série de transformações metabólicas dando origem aos seus remanescentes (IDL) e às LDL⁽⁷⁾.

As HDL são constituídas de fosfolipídeos (23%), ésteres de colesterol (15%), colesterol (3%), triacilgliceróis (8%) e apolipoproteínas (51%)⁽⁵⁴⁻⁷⁸⁾. As HDL sintetizadas no intestino têm como principal constituinte protéico a apo A-I (60%) e menores teores de apo A-II (25%), apo E (5-10%) e apo Cs (5-10%)⁽²⁴⁾. Por outro lado, nas HDL de origem hepática a apolipoproteína predominante é a apo E⁽⁵⁴⁻⁷⁸⁾.

As lipoproteínas recém-secretadas sofrem várias transformações antes de serem captadas pelas células e removidas da circulação sistêmica. Essas transformações

consistem principalmente nos seguintes processos: (1) hidrólise dos triacilgliceróis e fosfolipídeos das partículas, catalisada pelas lipases lipoprotéica e hepática; (2) transferência de lipídeos e apolipoproteínas entre as lipoproteínas e (3) esterificação do colesterol das HDL, catalisada pela lecitina-colesterol acil transferase.

No metabolismo dos quilomícrons, as partículas nascentes transferem fosfolipídeos, apo A-I e apo A-IV para as HDL e simultaneamente adquirem dessas, apo C e apo E^(31, 131). Esse processo tem início na circulação linfática e se acentua quando os quilomícrons atingem a circulação plasmática. A aquisição de apo C é fundamental para a ativação da enzima lipase lipoprotéica (LPL, E.C. 3.1.1.34), a qual catalisa a hidrólise dos triacilgliceróis dessas lipoproteínas⁽¹²¹⁾.

A lipase lipoprotéica é sintetizada nas células parenquimatosas de vários órgãos, posteriormente é transportada para a superfície luminal do endotélio capilar onde ocorre a sua atividade lipolítica^(121, 141).

Durante o processo de hidrólise dos triacilgliceróis dos quilomícrons, são liberados ácidos graxos e 2-monoacilgliceróis. Parte desses ácidos graxos é rapidamente captada pelos tecidos periféricos onde pode ser utilizada como fonte energética (músculo cardíaco e esquelético) ou pode ser armazenada na forma de triacilgliceróis (tecido adiposo)⁽⁵⁴⁾. O restante é transportado para o fígado, ligado à albumina.

O metabolismo dos quilomícrons no compartimento plasmático resulta na formação de partículas menores que contêm

apenas um teor residual de triacilgliceróis e apresentam uma relação colesterol/fosfolípidos aumentada. Nesse processo a apo C é transferida para as HDL, sendo que as apo B-48 e apo E permanecem na superfície das lipoproteínas⁽¹⁵²⁾. As partículas resultantes, denominadas remanescentes de quilomícron, são principalmente captadas pelo fígado por endocitose mediada por receptores que reconhecem a apolipoproteína E presente na partícula (receptor E)⁽⁷²⁾.

A captação dos remanescentes de quilomícron pelo fígado participa na regulação do metabolismo corpóreo do colesterol, pois promove uma potente inibição da síntese do colesterol nesse órgão, que é responsável por mais de 50% do nível deste esteróide presente no plasma⁽¹⁵⁷⁾.

A etapa inicial do metabolismo das VLDL é semelhante a dos quilomícrons. Na circulação sistêmica, as VLDL nascentes trocam elementos de superfície com as outras lipoproteínas, principalmente as HDL, enquanto seus triacilgliceróis são hidrolisados pela lipase lipoprotéica presente nos capilares dos tecidos periféricos^(54, 121). Durante o processo lipolítico formam-se partículas menores, os remanescentes das VLDL (IDL), que contêm menos triacilgliceróis, apo C e apo E que as suas precursoras^(7, 127).

Em muitas espécies, como no rato, a maioria dos remanescentes de VLDL são captados pelo fígado por endocitose mediada por receptores, sendo que apenas 5% dessas partículas são convertidas em LDL⁽⁷²⁾. Já no homem aproximadamente 50 % das VLDL são transformadas em LDL⁽¹²⁷⁾.

As VLDL constituem uma classe de lipoproteínas bastante heterogênea. As sub-classes de VLDL apresentam comportamentos metabólicos distintos: as de maior tamanho dão origem a remanescentes que contêm quantidades substanciais de apo E e são rapidamente captados pelo fígado, enquanto que as menores geram remanescentes com menor teor de apo E e apresentam maior tempo de residência no plasma, sendo predominantemente convertidas em LDL^(57,140).

A formação das LDL a partir dos remanescentes de VLDL (IDL) é resultante da hidrólise dos triacilgliceróis e fosfolipídeos, bem como da perda de apo E. A hidrólise dos lipídeos das IDL é promovida pela lipase hepática (HL, E.C. 3.1.1.3), enzima presente na superfície das células endoteliais hepáticas^(57,121). A perda de apo E parece resultar das alterações estruturais das IDL que acompanham o catabolismo dessas partículas⁽⁵⁴⁾.

As LDL compreendem também uma classe de lipoproteínas heterogêneas em tamanho e composição. Em média, as LDL são constituídas de ésteres de colesterol (38%), colesterol (9%), triacilgliceróis (11%), fosfolipídeos (22%) e apo B-100 (20%)⁽²⁴⁾. As LDL leves apresentam menor densidade, maior diâmetro e maior teor de triacilgliceróis que as LDL pesadas (mais densas)⁽¹¹²⁾. Devido a essas características físico-químicas, as sub-classes de LDL apresentam comportamentos metabólicos distintos. As LDL leves são removidas da circulação plasmática com maior velocidade que as LDL pesadas^(41,102,117).

Os remanescentes de VLDL e as LDL são removidos da circulação sistêmica por interação das apolipoproteínas constituintes com receptores celulares. Esses receptores têm afinidade tanto pela apo E quanto pela apo B-100 e por isso receberam a denominação de receptores B,E⁽⁷⁷⁾. Os remanescentes de VLDL são captados pela ligação da apo E, presente na superfície das partículas, com os receptores B,E dos hepatócitos⁽⁷²⁾. Já as LDL, as quais ligam-se aos receptores B,E por intermédio da apo B-100, são removidas com menor eficiência pelos receptores hepáticos e gradualmente atingem os compartimentos extra-vasculares de vários órgãos e tecidos, de forma que uma fração apreciável é captada pelos tecidos extra-hepáticos⁽⁵⁴⁾. No rato a maior parte da LDL formada é removida pelo fígado⁽¹²²⁾.

As LDL, partículas ricas em ésteres de colesterol, são responsáveis pelo transporte do colesterol endógeno para os tecidos periféricos, onde é utilizado na síntese de membranas de células em divisão e na formação de hormônios esteróides pela córtex da supra-renal e gônadas⁽⁸²⁾. Apesar de desempenharem esse importante papel fisiológico, as LDL são partículas altamente aterogênicas quando se acumulam no plasma⁽¹⁴⁰⁾.

O transporte dos lipídeos no plasma também é realizado pelas HDL. O colesterol presente nas membranas plasmáticas dos tecidos ou eritrócitos é removido e, a seguir, esterificado pela lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT, E.C. 2.3.1.43), a qual é ativada pela apo A-I presente na

superfície das HDL^(32.46.122). Simultaneamente, esse lipídeo é transferido para as HDL nascentes, que se tornam partículas esféricas (de HDL₃ para HDL₂).

Os ésteres de colesterol, formados no plasma por ação da LCAT, podem ser transferidos para as VLDL e LDL, as quais são subsequentemente captadas por vários órgãos e tecidos^(4.82).

Os processos de transferência de lipídeos entre as lipoproteínas no plasma são mediados pela ação de proteínas específicas, as proteínas de transferência dos ésteres de colesterol (CETP), dos fosfolipídeos (PLTP) e dos triacilgliceróis (TGTP)^(3.4.134). A transferência dos ésteres de colesterol de uma partícula de lipoproteína a outra é associada com a transferência recíproca de triacilgliceróis^(42.116).

Em várias espécies animais, como no homem e no coelho, a atividade da CETP é elevada e o colesterol recém-esterificado das HDL é rapidamente distribuído para as demais lipoproteínas plasmáticas, as quais são principalmente captadas pelo fígado⁽¹²²⁾. Nas espécies onde a atividade da CETP está diminuída, como no rato, os ésteres de colesterol permanecem nas HDL, que são removidas principalmente pelos receptores E e B₂ hepáticos^(32.138).

2. Captação celular das lipoproteínas

Os receptores fazem parte do mecanismo de remoção das lipoproteínas do plasma bem como uma forma de suprimento de colesterol e triacilgliceróis para as células⁽⁹⁹⁾. Os receptores, portanto, são responsáveis pela manutenção da homeostase dos lipídeos e das lipoproteínas no plasma e nos tecidos e, ao mesmo tempo, protegem as células do acúmulo desses lipídeos, principalmente do colesterol.

A superfície celular de fibroblastos humanos e uma variedade de outras células contém receptores de alta afinidade para as LDL, os receptores B,E^(13,48). Esses receptores são estruturas glicoproteicas que estão agrupadas em regiões definidas da membrana celular, onde a LDL se liga por intermédio da apo B-100 presente na partícula.

A importância da apo B-100 na interação entre a LDL e o receptor B,E foi estabelecida em experiências onde foram introduzidas modificações químicas em resíduos de aminoácidos específicos na molécula dessa apolipoproteína. As modificações dos resíduos de lisina ou arginina da apo B-100 por agentes químicos inibem a ligação da LDL aos receptores B,E de fibroblastos^(100,165).

O receptor B,E humano é constituído de 839 resíduos de aminoácidos e apresenta cinco domínios, sendo que o primeiro tem carga líquida negativa e corresponde ao sítio de ligação do receptor com a apolipoproteína ligante^(20,43,173).

A interação da LDL com o receptor B,E promove a endocitose da lipoproteína. Esse processo inicia-se com a

invaginação e posterior formação de vesícula nas regiões da membrana celular onde se localizam os receptores. Essas vesículas endocíticas, denominadas endossomas, migram através do citoplasma e se fundem com os lisossomas⁽⁴⁷⁾. O complexo receptor-lipoproteína se dissocia e o receptor livre é então reciclado para a superfície celular^(12,13). A seguir, ocorre a degradação hidrolítica da apo B-100, por ação de proteases lisossomais, bem como a hidrólise dos ésteres de colesterol pela lipase ácida lisossomal⁽⁴⁸⁾. O colesterol liberado pode ser utilizado para a síntese da membrana celular e também participa efetivamente na regulação da sua própria biossíntese pela célula^(14,99).

O colesterol incorporado pela célula atua sobre três vias metabólicas que asseguram a homeostase: (1) supressão da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA redutase, E.C. 1.1.1.34), enzima chave na biossíntese do colesterol; (2) ativação da acil CoA:colesterol aciltransferase (ACAT, E.C. 2.3.1.26), que esterifica o colesterol preferencialmente com ácido oleico, e (3) diminuição da síntese de receptores para LDL, o que inibe o fluxo adicional de colesterol plasmático para a célula^(14,144).

No fígado, o colesterol liberado pelas LDL pode ser excretado pelos canalículos biliares, ser oxidado a ácidos biliares primários, os quais também são excretados pelo sistema biliar, ou ser utilizado na biossíntese de lipoproteínas⁽⁹⁹⁾.

A atividade dos receptores B,E no fígado e em outros órgãos é regulada pela concentração intracelular de colesterol.

Em cães tratados com dieta rica em colesterol, observou-se que a atividade dos receptores B,E dos hepatócitos diminuiu significativamente a medida em que quantidade substancial de colesterol, sob a forma de remanescentes de quilomícrons, foi captada pelo fígado⁽¹⁾. Ao contrário, nas condições que induzem o catabolismo hepático do colesterol, como no tratamento com colestiramina, a atividade dos receptores B,E está aumentada nesse órgão^(79.146). Vários estudos demonstraram que doses farmacológicas de 17 α -etinil estradiol induzem o aumento do número de receptores B,E no fígado de ratos, que é responsável pelo aumento da velocidade de remoção plasmática das LDL^(23.41.149). Isto resulta em drástica diminuição dos níveis de LDL no plasma.

No homem, podem ocorrer vários tipos de alterações na expressão dos receptores B,E, tais como: modificações estruturais, diminuição ou mesmo ausência de atividade, ou ainda distúrbios no processo de entrada do complexo lipoproteína-receptor no citoplasma^(10.50). Essas alterações prejudicam o catabolismo das LDL, resultando em várias formas de hipercolesterolemia que frequentemente estão associadas à aterosclerose precoce^(52.49.50).

Estudos mais recentes mostraram que a diminuição do catabolismo das LDL também pode ser causada por alterações estruturais da apo B-100, o ligante da LDL para o receptor B,E^(86.140).

Além das LDL, outras lipoproteínas podem ligar-se ao receptor B,E. Os remanescentes de quilomícrons e das VLDL, as

β -VLDL (VLDL ricas em colesterol) e as HDL ricas em apo E isoladas de pacientes com hiperalfalipoproteinemia ligam-se aos receptores B,E de fibroblastos em cultura, por intermédio da apo E^(25,38,166,174).

A HDL rica em apo E, também conhecida por HDL₂, foi isolada pela primeira vez do plasma de cães que receberam uma alimentação rica em colesterol⁽¹²⁸⁾. Essa lipoproteína apresenta uma capacidade de ligação com o receptor B,E de fibroblastos cuja afinidade é vinte vezes maior que a da própria LDL. Em comparação com a LDL, quatro vezes menos partículas de HDL₂ são necessárias para saturar todos os sítios disponíveis nos receptores B,E, indicando que cada partícula de HDL₂ se liga a 4 sítios do receptor B,E, enquanto a LDL se liga a apenas um^(70,128). Por outro lado, a capacidade de ligação de HDL₂ com o receptor B,E é proporcional ao conteúdo de apo E da partícula⁽⁹⁹⁾.

A apo E, além de mediar a interação das lipoproteínas ricas em apo E com os receptores B,E, pode modular o metabolismo daquelas que contêm apo B-100. Exemplo disso é o comportamento metabólico dos remanescentes de VLDL: essas partículas ricas em apo E são removidas da circulação sistêmica com maior velocidade que as LDL, que contêm apenas a apo B-100⁽³³⁾. Os remanescentes de VLDL, ricos em apo E, são removidos da circulação com maior velocidade que as LDL, que contêm apenas a apo B-100.

A apo E compreende uma classe de apolipoproteínas que diferem em tamanho ou carga. Essa complexidade resulta de

mutações genéticas e de modificações pós-transcrição a nível das cadeias de carboidratos ligadas à molécula de apo E⁽¹⁸⁰⁾. O polimorfismo da apo E é devido a presença de três alelos comuns (ε2, ε3 e ε4) presentes em um único locus^(98,180). A combinação desses alelos pode gerar seis diferentes fenótipos, três homozigóticos (E_{2/2}, E_{3/3} e E_{4/4}) e três heterozigóticos (E_{3/2}, E_{4/2} e E_{4/3})^(98,180). O fenótipo E_{3/3} é o mais comum e está presente em 60% da população. O fenótipo E_{2/2} (apo E₂) difere do E_{3/3} (apo E₃) pela substituição da arginina pela cistina na posição 158 da sequência de aminoácidos da apo E, enquanto que o fenótipo E_{4/4} (apo E₄) difere da apo E₃ por substituição da cisteína-112 pela arginina. Essas diferenças na estrutura primária influenciam a capacidade de ligação da apo E pelo receptor B,E, sendo que a E₂ possui afinidade aproximadamente 100 vezes menor pelo receptor B,E que a apo E₃. Os indivíduos que apresentam o fenótipo apo E₂ têm níveis plasmáticos das VLDL e de seus remanescentes aumentados, que estão associados com a disbetalipoproteinemia familiar (hiperlipoproteinemia III) e representam riscos em potencial para o desenvolvimento da aterosclerose^(98,180). No fenótipo E_{4/4} (apo E₄) a capacidade de ligação ao receptor B,E é normal, porém os níveis plasmáticos de colesterol e de LDL estão elevados^(98,147,180).

Outro tipo de receptor, os receptor E, atua como mediador da captação dos remanescentes de quilomícrons pelo fígado⁽⁷²⁾. Esse receptor foi inicialmente identificado na membrana plasmática do fígado de ratos e de cães

adultos^(18,64). Posteriormente, verificou-se que pacientes com hipercolesterolemia familiar, bem como coelhos Watanabe com hiperlipidemia hereditária (WHHL), apresentavam catabolismo dos remanescentes de quilomícrons normal^(49,52).

A captação hepática dos remanescentes de quilomícrons pelos receptores E é mediada pela apo E, sendo que a apo C tem um papel regulatório. O enriquecimento de quilomícrons da linfa com a apo E resultou em rápida captação hepática dos seus remanescentes, enquanto que a adição de apo C aos quilomícrons enriquecidos com apo E inibiu a sua captação pelo fígado^(158,168). Por outro lado, há evidências de que a apo B-48 não participa na interação dos remanescentes de quilomícrons com o receptor E^(66,179).

Além da sua alta afinidade pelos remanescentes de quilomícrons, os receptores E hepáticos também ligam a HDL₂, sendo a apo E de fundamental importância nessa ligação⁽¹⁴³⁾. Isto foi demonstrado através da modificação química dos resíduos de arginina e lisina da apo E⁽⁶⁴⁾. Quando a apo E foi modificada houve uma redução significativa na velocidade de captação hepática da HDL₂.

Recentemente foi detectada uma glicoproteína (LRP) que apresenta estreita homologia estrutural com o receptor B₂E⁽⁵⁹⁾. Essa proteína ocorre na superfície celular de várias células principalmente nos hepatócitos e tem capacidade de ligar lipoproteínas ricas em apo E de modo semelhante ao receptor E^(6,63,93,142).

Em humanos, 2/3 das LDL se ligam às células através dos receptores B,E e o restante por outras vias, como a dos receptores sequestradores, que estão presentes nas células do retículo endotelial, como os macrófagos e as células endoteliais^(13,50,74). Por outro lado, esses receptores promovem também a captação das LDL modificadas^(14,53,119).

Os macrófagos expressam poucos receptores B,E e um grande número de receptores para LDL modificada⁽¹⁴⁾. A interação desses últimos com a LDL modificada resulta na endocitose da partícula, sendo a apo B-100 modificada hidrolisada a aminoácidos e os ésteres de colesterol hidrolisados pela colesterol esterase lisossomal. Parte do colesterol é secretado e parte é esterificado pela ACAT e armazenado no citoplasma⁽¹⁴⁾.

A regulação da homeostase do colesterol pelos receptores para LDL modificada é fundamentalmente diferente daquela dos receptores B,E. Enquanto a atividade dos receptores B,E é controlada pelos níveis intracelulares de colesterol, nos receptores para LDL modificada esse controle é inadequado. A incubação de macrófagos derivados de monócitos humanos com LDL acetilada, por longo tempo, resulta no aumento significativo do conteúdo intracelular de ésteres de colesterol⁽¹⁴⁾. O acúmulo desses lipídeos nos macrófagos provoca a transformação dos mesmos em células espumosas, semelhantes àsquelas encontradas nas lesões ateroscleróticas⁽¹⁴⁾.

Foi observado que as células endoteliais e as células da musculatura lisa da camada íntima das artérias podem modificar a estrutura da LDL, principalmente por processos oxidativos dos lipídeos ou da apo B-100⁽²⁹⁾. Por outro lado, essas células apresentam quantidade substancial de receptores para LDL modificada e podem acumular ésteres de colesterol no seu interior⁽²⁹⁾.

A importância fisiológica do receptor para LDL modificada e o modo pelo qual a LDL é alterada não estão totalmente elucidados. A modificação química da LDL poderia ocorrer in vivo por ação do dialdeído malônico, o qual é liberado pelas plaquetas ou produzido durante a peroxidação lipídica⁽³⁰⁾. Portanto, a modificação da LDL pode contribuir para o acúmulo de ésteres de colesterol nas células no processo de aterogênese.

Os macrófagos e as células endoteliais também apresentam receptores específicos para as β -VLDL, lipoproteínas ricas em colesterol, que se acumulam no plasma de animais alimentados com dieta rica em colesterol e de pacientes com hiperlipoproteinemia tipo III^(34,45,50). Após a captação, as β -VLDL são degradadas nos lisossomos, e o colesterol liberado é esterificado no citoplasma onde se acumula^(14,159). O acúmulo dos ésteres de colesterol nessas células promove a transformação das mesmas em células espumosas, processo fundamental na gênese das lesões ateroscleróticas^(14,51,65).

A presença de uma apolipoproteína específica na superfície da partícula não é o único fator que determina a

interação da lipoproteína com um dado receptor. O conteúdo lipídico ou o tamanho da partícula de lipoproteína influenciam de modo significativo nessa interação. Como vimos, durante a conversão das VLDL em LDL na circulação sistêmica, ocorre diminuição no tamanho das VLDL bem como no seu teor de triacilgliceróis. Essas alterações da composição lipídica, principalmente no núcleo das partículas, são acompanhadas por redução do teor de apo E e por mudanças na conformação da apo B-100^(24,106). À medida em que as lipoproteínas que contêm apo B-100 tornam-se menores, diminui a participação da apo E na captação celular das partículas enquanto a da apo B-100 aumenta. Estudo in vitro mostrou que a redução dos triacilgliceróis na LDL favorece o reconhecimento de determinantes antigênicos da apo B-100 por anticorpos monoclonais e também potencializa a interação dessa apolipoproteína com os receptores B,E⁽²⁾. Por outro lado, o enriquecimento da LDL com triacilgliceróis provoca a diminuição da imunorreatividade da apo B-100 e reduz a sua capacidade de ligação com os receptores B,E⁽⁷⁵⁾.

3. Apolipoproteína B

A apolipoproteína B (apo B) é um componente estrutural das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis e das LDL, constituindo aproximadamente 25% das proteínas dos quilomícrons, 50% das proteínas das VLDL e 95 a 98 % das proteínas da LDL^(24,152).

No plasma humano, a apo B ocorre em duas formas primárias designadas B-100 e B-48, que possuem massa molecular relativa (M_r) de 513 KDa e 246 KDa, respectivamente^(73,152). Essas duas formas são produtos do mesmo gene, sendo que a apo B-48 resulta de modificação pós-transcrição da apo B-100^(26,27). A apo B-100 é uma glicoproteína constituída de 4536 resíduos de aminoácidos e contém 8-10% de carboidratos^(74,89,175,176,181).

A apo B-48 é necessária à estruturação e secreção dos quilomícrons pelos enterócitos, contribuindo desta forma para o transporte dos lipídeos provenientes da dieta⁽¹³¹⁾. A apo B-100, que é produzida pelo fígado em seres humanos, é necessária para a síntese e secreção das VLDL, cujo catabolismo intravascular resulta na formação das IDL e LDL^(73,124). Estudos recentes revelaram que o intestino humano é também capaz de sintetizar e secretar apo B-100^(61,91).

Duas outras formas de apo B, B-26 e B-74, também foram detectadas. Essas apolipoproteínas representam produtos de degradação da apo B-100 e podem ser produzidos por ação de proteases tanto in vitro quanto na circulação plasmática humana^(17,56).

No rato, foram identificadas duas formas de apo B, uma de $M_r = 335$ KDa e outra de $M_r = 240$ KDa^(35,172). A forma de alta M_r (apoB_H ou apo B-100) é sintetizada predominantemente pelo fígado e tem taxa catabólica lenta, enquanto que a forma de baixa M_r (apoB_L ou apo B-48) é sintetizada tanto pelo

intestino quanto pelo fígado e tem taxa catabólica rápida^(47,150,151).

Como no homem, as VLDL do rato contêm uma única molécula de apo B por partícula⁽³⁴⁾. No rato, os remanescentes de VLDL formados a partir das VLDL com apo B-48 são mais rapidamente removidos do plasma que aqueles que contêm apo B-100, o que contribui para a maior reciclagem dos triacilgliceróis hepáticos em relação ao que ocorre em humanos⁽⁴³⁾. Em estudos recentes, demonstrou-se que o plasma de ratos apresenta outra forma de apo B de $M_r = 320$ KDa, a apo B-95, entretanto a sua função e a sua relação estrutural com a apo B-100 não estão bem definidas^(152,170).

Como vimos, a apo B-100 é o componente que liga as partículas de LDL aos receptores B,E, os quais determinam a remoção das LDL do plasma e regulam a biossíntese celular do colesterol^(13,77). Essa apolipoproteína apresenta domínios polares intercalados com outros apolares, que permitem a associação da apolipoproteína com os lipídeos na molécula de LDL, bem como a sua interação com o receptor B,E. Devido a essas características estruturais e a sua alta M_r , a apo B-100 apresenta-se sob a forma alongada que envolve a partícula de LDL⁽¹⁷⁷⁾. A apo B-100 possui cinco domínios, sendo que o quarto domínio, compreendido entre os resíduos de aminoácidos 3070-4100, apresenta carga líquida positiva e é o responsável pela interação da apo B-100 com o receptor B,E^(76,88,105,111).

As regiões apolares da molécula de apo B-100 são semelhantes às detectadas nas proteínas de membrana.

Essas regiões estão associadas com a interface lipídica da partícula e possivelmente são responsáveis pela sua insolubilidade em meio aquoso, o que impede a sua transferência entre as lipoproteínas no plasma⁽²⁷⁾. Devido a essas características a apo B-100 acompanha a partícula de lipoproteína desde a síntese até a sua degradação intracelular. Desta forma, a apo B pode ser utilizada como traçador da partícula de LDL e/ou VLDL nos estudos de metabolismo plasmático⁽¹⁷⁹⁾.

A molécula de apo B-100 também apresenta regiões definidas capazes de ligar heparina e vários proteoglicanos encontrados na parede arterial, os quais promovem a ligação das VLDL ao endotélio capilar, onde os triacilgliceróis são hidrolisados pela ação da lipase lipoprotéica⁽¹⁷⁹⁾. Por outro lado, essa ligação pode facilitar a captação das LDL pelas células endoteliais, o que representa um fator importante na patogenia da aterosclerose⁽¹⁷⁸⁾.

Têm sido descritos defeitos genéticos da apo B, como a hiperapoB e a apo B-100 defeituosa familiar, que podem resultar em diminuição da remoção plasmática dos remanescentes de VLDL e das LDL⁽¹⁸²⁾.

Na hiperapoB, a alteração estrutural da apo B-100 resulta da substituição da arginina, da posição 4019 na sequência primária da molécula de proteína, pelo triptofano⁽⁸⁸⁾. A hiperapoB é caracterizada por aumento de partículas de LDL pequenas e densas devido a uma superprodução de LDL, secundária ao aumento da síntese de apo B-100 e de VLDL

no fígado, que está associada a diminuição na remoção plasmática da LDL^(84,87,177). Essas alterações metabólicas estão fortemente associadas com a doença coronariana prematura, embora alguns pacientes com hiperapob apresentem níveis normais de colesterol e triacilgliceróis no plasma^(86,87).

A apo B-100 defeituosa familiar ocorre por substituição da arginina-3500 pela glutamina^(88,149). Essa mutação altera a conformação do domínio de ligação da apo B-100 aos receptores B,E, prejudicando a interação das LDL com esses receptores^(94,160). Com isso há uma redução na remoção plasmática das LDL, que se acumulam no plasma, levando a hipercolesterolemia moderada ou severa que é importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças ateroscleróticas^(28,30,71).

4. Modelos de emulsões artificiais

As emulsões lipídicas preparadas artificialmente são utilizadas para estudar as propriedades estruturais e interativas dos constituintes lipídicos e protéicos das lipoproteínas^(94,95, 109,110, 155).

A facilidade de preparação e padronização das emulsões artificiais estão entre as principais vantagens deste modelo. Além disso, a modificação da sua composição química permite estudar sistematicamente a influência de cada um dos componentes sobre as propriedades físico-químicas e biológicas da partícula. Outro fator importante é a facilidade de marcação isotópica dos constituintes da emulsão.

As analogias físico-químicas entre as emulsões preparadas artificialmente e as lipoproteínas naturais têm despertado o interesse de muitos investigadores em estudar as propriedades biológicas dessas emulsões.

REDGRAVE e MARANHÃO⁽¹³³⁾, mostraram que emulsões ricas em triacilgliceróis podem ter comportamento metabólico semelhante ao dos quilomícrons da linfa, quando injetadas na circulação sanguínea de ratos. Da mesma forma que os quilomícrons, as partículas da emulsão sofreram a ação da lipase lipoprotéica gerando remanescentes que foram captados principalmente pelo fígado. Em estudos subsequentes, verificou-se que as modificações na composição química desses quilomícrons produzidos artificialmente influenciavam a sua remoção plasmática^(104, 115, 132, 134, 137).

Nosso grupo estudou vários aspectos do comportamento metabólico de emulsões ricas em triacilgliceróis, tanto em ratos quanto em seres humanos^(37, 40, 103, 123, 145). Observou-se que a remoção plasmática das partículas de emulsão é mediada pelos mesmos sítios de captação hepática que os das lipoproteínas naturais⁽¹²³⁾. Por outro lado, os quilomícrons artificiais transferem elementos de superfície para as HDL ou LDL plasmáticas, em ratos, sendo que a transferência é alterada em ratos diabéticos, hipotireoideos ou na vigência de consumo de álcool⁽¹³⁹⁾.

Em 1982, foram desenvolvidas emulsões, constituídas de fosfolipídeos e ésteres de colesterol, cujas propriedades físico-químicas são semelhantes à fase lipídica da LDL

natural^(44,141). Posteriormente, outros pesquisadores estudaram a estrutura e a dinâmica dessas emulsões^(92,113,135). GINSBURG e cols.⁽⁴⁵⁾ incorporaram a apo B humana a essas emulsões, obtendo complexos (fosfolipídeos-ésteres de colesterol-apo B) que exibiam muitas das propriedades estruturais da LDL natural. Estudos in vitro mostraram que as partículas de emulsão com a apo B associadas à sua estrutura apresentaram padrão de ligação, interiorização e degradação por fibroblastos humanos semelhante à LDL⁽⁹⁷⁾.

Em 1987, o nosso grupo iniciou estudos do metabolismo de emulsões de composição semelhante à fase lipídica da LDL não contendo apo B⁽²²⁾. As partículas da emulsão, quando injetadas intra-arterialmente em ratos, apresentaram taxa de remoção plasmática semelhante à da LDL natural. Quando incubadas com lipoproteínas do plasma de rato, essas partículas adsorveram as apolipoproteínas solúveis, principalmente a apo E, fundamental para a sua remoção plasmática⁽²¹⁾. Ao se alterar a composição química dessa emulsão observou-se efeitos importantes no metabolismo da mesma. A adição de colesterol não esterificado à composição da emulsão resultou em maior capacidade de adsorção de apolipoproteínas in vitro, bem como maior taxa de remoção plasmática, em ratos, que a emulsão original⁽²¹⁾. Por outro lado, o enriquecimento das partículas de emulsão com quantidades crescentes de triacilgliceróis acelerou a remoção plasmática das mesmas de forma proporcional⁽¹²⁴⁾. No entanto, nenhum estudo in vivo foi realizado para verificar se a apo B modifica o comportamento metabólico de emulsões semelhantes à

fase lipídica da LDL, o que poderia mostrar a analogia entre esse modelo experimental e o metabolismo da LDL natural.

OBJETIVO

O presente trabalho visou elucidar como a presença da apo B influencia a remoção plasmática da LDL e a sua captação pelos diversos órgãos, utilizando o modelo das emulsões semelhantes à fase lipídica da LDL. Para isso, estudamos em ratos a cinética plasmática e a distribuição tecidual dessas emulsões marcadas isotopicamente, às quais a apo B foi incorporada à sua estrutura, comparando o seu comportamento metabólico ao das emulsões sem apo B. Em outros experimentos, os animais foram tratados previamente com 17α -etinil estradiol, o que induz o aumento do número de receptores B,E celulares, para testar o mecanismo de remoção das emulsões.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados nos experimentos ratos machos adultos Wistar, pesando entre 250 e 350 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, mantidos com ciclo luz de 12 horas, livre acesso à ração (Purina Nutrimentos Ltda, Campinas, SP) e água.

Sete ratos, pesando entre 250 e 300 g, receberam tratamento prévio com 17 α -etinil estradiol (5mg/Kg de peso) e três foram tratados com propilenoglicol (2,5 mL/Kg de peso), diluente do 17 α -etinil estradiol, os quais serviram como controle daqueles tratados com o estrógeno (23). As doses foram administradas subcutaneamente, por cinco dias. Após o tratamento, foram colhidas amostras de sangue desses animais para a determinação dos lipídeos plasmáticos.

2. Materiais

Os lipídeos oleato de colesterol (CO) e trioleína (TO) foram adquiridos da Nu-Check Prep. (Elysian, EUA) e a fosfatidilcolina (FC) da Lipid Products (Surrey, Inglaterra). Foram preparadas soluções-estoque desses lipídeos em clorofórmio:metanol (2:1, v/v), as quais foram armazenadas a -20°C.

Os lipídeos marcados isotopicamente: [1-¹⁴C]-oleato de colesterol (atividade específica de 2,1GBq/mmol), éter

oleico de [1 α ,2 α (n)- 3 H]-colesterol (atividade específica de 143 TBq/mmol), tri-[9,10(n)- 3 H]-oleato de glicerol (atividade específica de 37 GBq/mmol) e 1,2-dipalmitoil L-3-fosfatidil[N-metil- 3 H]-colina (atividade específica de 2,81 TBq/mmol), bem como o [14 C]-deoxicolato de sódio ([14 C]-NaDC, atividade de 2,15 GBq/mmol), foram adquiridos da Amersham International (Amersham, Inglaterra).

A pureza dos lipídeos foi verificada por cromatografia em camada delgada (0,5 mm de espessura), utilizando-se sílica gel 60H e sistema solvente de hexana:éter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v).

Os solventes orgânicos e os demais reativos foram adquiridos da Merck-Quimitra (Rio de Janeiro, RJ) e da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA).

3. Métodos

3.1. Isolamento da apolipoproteína B do plasma de rato

3.1.1. Obtenção da LDL de rato ⁷⁷

O sangue de 200 ratos machos adultos Wistar, com peso entre 300 e 350 g, foi obtido por punção da artéria abdominal, após serem anestesiados com éter etílico. Imediatamente adicionou-se a esse material EDTA sódico 0,25 M e benzaminidina 0,2 M (concentração final de 2,5 mM e 2 mM, respectivamente). Logo após, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm, por 10 min, à temperatura ambiente. Separou-se o plasma, ao qual foram adicionados azida sódica (NaN₃) e fluoreto de

fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,2M (concentração final de 7,7 mM e 1 mM, respectivamente).

O plasma recém-obtido foi submetido a ultracentrifugação (Centrífuga Beckman L50-E, rotor TY40, Palo Alto, EUA) a 40.000 rpm, por 24 h, a 10°C. A seguir, descartou-se o sobrenadante (3mL/tubo), onde estavam presentes os quilomícrons e as VLDL. O volume inferior teve a sua densidade ajustada para 1,065 g/mL, pela adição de KBr sólido e foi submetido a ultracentrifugação nas mesmas condições anteriores. Ao final desta etapa, os volumes dos sobrenadantes (1mL/tubo) foram reunidos, a densidade foi ajustada para 1,065 g/mL pela adição de KBr sólido e foram submetidos a outra etapa de ultracentrifugação (40.000 rpm, 24 h, 10°C). A fração contendo LDL de rato foi recuperada no sobrenadante (2mL/tubo).

3.1.2. Isolamento da apolipoproteína B de rato ⁽¹⁴³⁾

A LDL recém-isolada foi dialisada em 4 litros de tampão Bicarbonato (NaHCO_3 0,1 M, EDTA sódico 1 mM, NaN_3 0,15 mM, pH 8,6) por 24 h, a 4°C. A seguir foi alquilada com excesso de iodacetamida 1,5 M, a 25°C, por 2 h, no escuro e sob agitação (Banho de água tipo Dubnoff, Fanen, São Paulo). A LDL alquilada foi dialisada em 4 litros de tampão TES (ácido N -tris[hidroximetil]metil-2-aminoetano>sulfônico 20 mM, NaCl 0,15 M, EDTA sódico 1 mM, NaN_3 0,15 mM, pH 7,4) por 24 h, a 4°C, para a completa remoção de iodacetamida. Posteriormente, foi dialisada em 4 litros de tampão Carbonato (NaCl 50 mM, Na_2CO_3 50 mM, EDTA sódico 1 mM, NaN_3 0,15 mM, pH 10,0) por 24 h, a 4°C para a completa remoção do tampão TES.

A LDL foi solubilizada com deoxicolato de sódio (NaDC) sólido, 55 mg de NaDC/mg de proteínas da LDL, com homogeneização lenta, por 3 h, a 25°C e no escuro. Durante este processo formaram-se micelas de NaDC-apo B e NaDC-lipídeos da LDL.

A apo B (NaDC-apo B) foi isolada por cromatografia em gel de Sepharose CL-4B (coluna com dimensões de 2,5x50 cm). A resina foi previamente equilibrada com tampão NaDC (NaCl 50 mM, Na₂CO₃ 50 mM, NaDC 10 mM e EDTA sódico 1 mM, NaN₃ 0,15 mM, pH 10,0), a temperatura de 10°C. A eluição foi realizada com o mesmo tampão, com um fluxo de 0,4 mL/min, a 10°C. Foram obtidas frações de 4 mL cada, nas quais determinou-se os teores de proteínas, de colesterol e de fosfolipídeos. Os elutos correspondentes aos complexos NaDC-apo B foram reunidos e concentrados a 2 mg de proteína/mL, por sistema de ultrafiltração (membrana YM-10, Amicon CO, Danvers, EUA) e armazenados a 4°C. A integridade da apo B foi verificada, em cada etapa, por eletroforese em gel de poliacrilamida⁽¹²⁰⁾.

3.2. Preparação das emulsões e associação com a apolipoproteína B

3.2.1. Preparação das emulsões⁽⁴⁴⁾

Foram preparadas duas emulsões de mesma composição, com diferente marcação isotópica. Uma delas foi marcada com os isótopos éter oleico de [1alfa,2alfa(n)-³H]-colesterol ([³H]-CE), tri-[9,10(n)-³H]-oleato de glicerol ([³H]-TO) e 1,2-dipalmitoil L-3-fosfatidil[N-metil-³H]-colina ([³H]-FC), com

atividade de 1,65 MBq de cada isótopo para 100 mg de lipídeos totais. A outra foi marcada com 1,51 MBq de [1- 14 C]-oleato de colesterol ([1- 14 C]-CO) para 100 mg de lipídeos. O [3 H]-CE foi utilizado para medir a porcentagem de captação das emulsões pelos tecidos, uma vez que esse traçador acumula-se nas células após ser captado, não retornando ao compartimento extracelular⁽¹⁵³⁾. Utilizou-se o éster de colesterol [1- 14 C]-CO como traçador da segunda emulsão para verificar a semelhança de comportamento metabólico entre os dois isótopos.

Cada emulsão foi preparada a partir da mistura de 20 mg de oleato de colesterol, 40 mg de fosfatidilcolina e 0,6 mg de trioleína. Às misturas adicionou-se os lipídeos marcados isotopicamente. A seguir, essas misturas foram secas sob fluxo de nitrogênio e mantidas em dessecador à vácuo, por 12 a 16 horas a 4°C, para a completa remoção dos solventes residuais. Posteriormente, adicionou-se 10 mL de tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0 e os lipídeos foram emulsificados por sonicação durante 3 horas sob fluxo de nitrogênio, à temperatura de 51-55°C mantida por meio do termocirculador Quimis (Quimis S/A, São Paulo, SP). Para a sonicação utilizou-se o desintegrador de células Branson Mod. B450 (Arruda Ultrassom, São Paulo, SP), equipado com ponta de 1 cm de diâmetro, com potência de 125 Watts, em modo de operação contínua.

As emulsões foram purificadas por ultracentrifugação (Centrífuga Hitachi mod. 70P-72, rotor RBP 40T, Tokio, Japão) a 35.000 rpm, por 30 min, a 4°C. Alíquota de 1 mL do sobrenadante, contendo partículas com densidade menor que 1,006

g/mL, foi aspirada e descartada. O volume inferior teve a sua densidade ajustada para 1,22 g/mL, mediante a adição de KBr sólido e foi submetido a ultracentrifugação (Centrífuga Hitachi mod. 70P-72, rotor RBP 40T, Tokio, Japão) a 35.000 rpm, por 2 h, a 4°C. Ao final deste processo, obteve-se alíquota de 2,5 mL do sobrenadante contendo as partículas da emulsão purificada.

As emulsões foram, então, dialisadas por 24 h, a 4°C, em 4 litros de tampão, utilizando-se saco de diálise Spectrapor 6 (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, EUA), para a total remoção do KBr utilizado na etapa de purificação. Para a diálise da emulsão marcada com [³H]-CE, [³H]-TO e [³H]-FC foi utilizado tampão Carbonato e para a outra utilizou-se tampão TRIS-HCl 0,01 M (pH 8,0).

3.2.2. Associação da apolipoproteína B com as emulsões⁽⁴⁵⁾

Uma alíquota da emulsão dialisada com tampão Carbonato, contendo 3,0 mg de oleato de colesterol (em 2 mL de tampão Carbonato), foi transferida para um saco de diálise Spectrapor 3 (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, EUA) aberto que foi inerso em 4 litros de tampão Carbonato. A seguir, uma alíquota de apo B (0,75 mg/2 mL de tampão NaDC) foi adicionada à emulsão, por meio de uma bomba peristáltica LKB 2120 (LKB, Wallac, Finlândia), com um fluxo de 0,5 mL/h, por 4 h. Esse sistema de diálise foi mantido à temperatura ambiente, por 24 horas, período em que foram feitas duas trocas de 4 litros do tampão Carbonato para a completa remoção do NaDC, a qual foi monitorizada utilizando-se [¹⁴C]-NaDC. Durante este processo,

houve dissociação dos complexos NaDC-apo B, o NaDC se dissolveu no tampão de diálise e as moléculas de apo B associaram-se às partículas da emulsão (164).

A emulsão, contendo então a apo B, teve a sua densidade ajustada para 1,22 g/mL, mediante a adição de KBr sólido. A seguir, foi submetida a ultracentrifugação (Centrífuga Hitachi mod. 70P-72, rotor RBP 40T, Tokio, Japão) a 35.000 rpm, por 2 h, a 4°C. Aliquota de 2 mL do sobrenadante foi recuperada e dialisada em 4 litros de tampão TRIS-HCl 0,01 M (pH 8,0), por 24 h, a 4°C.

3.2.3. Análise dos constituintes das emulsões

Os triacilgliceróis, o colesterol total e os fosfolipídeos das emulsões foram determinados segundo os métodos de SOLONI⁽¹⁴⁸⁾, LEFFLER e McDOUGALD⁽⁹⁰⁾ e BARTLETT⁽⁵⁾, respectivamente.

3.3. Obtenção da LDL de rato marcada isotopicamente

3.3.1. Isolamento das LDL e HDL do plasma de rato⁽⁷⁷⁾

Para o isolamento das LDL do plasma (item 3.1.1.), foram utilizados 50 ratos machos adultos Wistar com peso entre 300 e 350 g. A fração contendo as LDL foi recuperada no sobrenadante (1mL/tubo), sendo que o volume inferior teve a sua densidade ajustada para 1,21 g/mL, pela adição de KBr sólido e foi submetido a ultracentrifugação (Centrífuga Beckman L50-E, rotor TY40, Palo Alto, EUA) a 40.000 rpm, por 24 h, a 10°C. A fração contendo as HDL foi recuperada do sobrenadante (1mL/tubo).

As frações contendo as LDL e as HDL tiveram as suas densidades ajustadas para 1,050 e 1,21 g/mL, respectivamente, e foram submetidas a nova etapa de ultracentrifugação, nas mesmas condições anteriores. As LDL e HDL purificadas foram recuperadas do sobrenadante (2 mL/tubo) e dialisadas em 4 litros da solução de diálise (NaCl 0,15 M, EDTA sódico 1 mM e NaN_3 0,15 mM, pH 7,0) por 24 h, a 4°C.

3.3.2. Isolamento da fração de $d > 1,25$ g/mL do plasma humano⁽¹⁵⁴⁾

O sangue de 10 doadores humanos foi obtido por punção venosa e centrifugado a 3.000 rpm, por 10 min, à temperatura ambiente. O plasma foi separado e teve a sua densidade ajustada para 1,21 g/mL, pela adição de KBr sólido. A seguir, foi ultracentrifugado (Centrífuga Beckman L50-E, rotor TY40, Palo Alto, EUA) a 40.000 rpm, por 24h, a 10°C. O sobrenadante (3 mL/tubo) foi descartado, o volume inferior teve a sua densidade ajustada para 1,25 g/mL e foi submetido a ultracentrifugação nas mesmas condições da etapa anterior. Em seguida, o sobrenadante foi descartado (3mL/tubo) e a fração de $d > 1,25$ g/mL foi recuperada na fase inferior, que foi então dialisada em 4 litros da solução de diálise (NaCl 0,15 M, EDTA sódico 1 mM e NaN_3 0,15 mM, pH 7,0) por 24 h, a 4°C, sendo utilizada para a marcação da LDL natural.

3.3.3. Marcação isotópica da HDL de rato⁽¹⁵⁴⁾

Alíquotas da fração HDL de rato (5 µg de proteína/tubo) foram liofilizadas e os lipídeos foram removidos

com heptano a $-10^{\circ}\text{C}^{(125)}$. A seguir, foram adicionados 300 μg de colesterol não esterificado, éter oleico de $[^3\text{H}]$ -colesterol ($0,14 \times 10^4$ Bq/tubo) e 2 mL de tampão TRIS-HCl 0,01 M (pH 8,0). Essa mistura foi submetida à emulsificação, sob fluxo de nitrogênio, por quatro períodos de 30 segundos, à temperatura ambiente. Para isso, utilizou-se o desintegrador de células Branson mod. B450 (Arruda Ultrassom, São Paulo, SP), equipado com ponta de 4 mm, com potência de 150 Watts.

Aliquotas de 4,5 mL da mistura emulsificada foram transferidas para tubos de centrífuga, adicionando-se 6,0 mL de solução de NaCl 0,9%, sendo posteriormente submetidas a ultracentrifugação (Centrífuga Hitachi mod. 70P-72, rotor RBP 40T, Tokio, Japão) a 39.000 rpm, por 2 h, a 4°C . A seguir, retirou-se 3 mL do sobrenadante e ajustou-se a densidade da fase inferior para 1,065 g/mL com KBr sólido, centrifugando-se esta fase (Centrífuga Hitachi mod. 70P-72, rotor RBP 40T, Tokio, Japão) a 39.000 rpm, por 24 h, a 4°C . O sobrenadante (4mL) foi descartado, e a fase inferior (HDL) foi dialisada em 4 litros de solução de Diálise (NaCl 0,15 M, EDTA sódico 1 mM, NaN_3 0,15 mM, pH 7,0) e utilizada para a marcação da LDL.

3.3.4. Marcação isotópica da LDL de rato

A marcação isotópica da LDL com éter oleico de $[^3\text{H}]$ -colesterol foi realizada segundo o método de STEIN e cols.⁽¹³⁴⁾, pelo qual o éster de colesterol é transferido das HDL para as LDL por ação da proteína de transferência desse lipídeo (CETP), presente em quantidade significativa no plasma humano (fração de densidade $> 1,25$ g/mL).

Alíquota contendo 2 a 4 mg de proteína da fração LDL recém-isolada foi incubada com a fração HDL marcada isotopicamente e a fração do plasma humano com $d > 1,25$ g/mL (concentrações finais de 1,5 e 35 mg de proteína/mL, respectivamente), num volume final de 3 a 4 mL, por 18 h, a 37°C e sob agitação (Banho de água tipo Dubnoff, Fanen, São Paulo).

Após a incubação, a densidade dessa solução foi ajustada para 1,050 g/mL com KBr sólido e submetida à ultracentrifugação (Centrífuga Hitachi mod. 70P-72, rotor RBP 40T, Tokio, Japão) a 39.000 rpm, por 24 h, a 4°C. A LDL marcada foi recuperada no sobrenadante (2,5 mL) e submetida à diálise em 4 litros de tampão TRIS-HCl 0,01 M (pH 8,0), por 24 h, a 4°C. A pureza de cada fração de lipoproteínas foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida⁽¹²⁰⁾.

3.4. Métodos analíticos

O teor de proteínas da emulsão com apo B, das lipoproteínas, dos eluatos obtidos na separação cromatográfica da apo B e das incubações foi determinado segundo o método de MARKWELL e cols.⁽¹⁰⁷⁾.

O níveis plasmáticos de colesterol total, triacilgliceróis e fosfolipídeos dos animais tratados com 17 α -etinil estradiol foram determinados pelos métodos de SIEDEL e cols.⁽¹⁴⁴⁾, WAHLEFELD⁽¹⁴²⁾ e BARTLETT⁽⁵⁾, respectivamente.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com dodecilsulfato de sódio (SDS) utilizada em várias etapas deste

trabalho foi realizada de acordo com o método descrito por NEVILLE⁽¹²⁰⁾.

3.5. Estudo da remoção plasmática das emulsões e LDL e da distribuição em órgãos

3.5.1. Preparação dos animais

Trinta e nove ratos, com peso entre 250 e 300 g, foram submetidos à canulação da artéria carótida sob efeito anestésico de éter dietílico. Utilizou-se catéteres PE-50 (Clay Adams, New Jersey, EUA) previamente siliconizados (silicone Prontosil, Flumen, Volta Redonda, RJ) para retardar a coagulação sanguínea no interior do catéter durante as colheitas de sangue. Após a cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas de restrição tipo Bollman, e aí mantidos durante a recuperação da anestesia (mínimo de 2 h) e a execução subsequente do experimento. Desses animais, 7 foram tratados previamente com 17 α -etinil estradiol (17-EE) e 3 com propilenoglicol (controle).

3.5.2. Protocolo das experiências

Alíquotas (0,5 mL) das emulsões e da LDL foram injetadas intra-arterialmente nos animais, a fim de estudar a remoção plasmática dos seus componentes lipídicos e a distribuição em diversos órgãos. Para cada animal, a atividade de cada alíquota correspondeu aproximadamente a 15.000 Bq para o isótopo ^3H e de 16.700 Bq para o isótopo ^{14}C .

Após a injeção das partículas, foram colhidas amostras de sangue (0,3 mL) dos animais, nos tempos de 5 min,

30 min, 1h, 2h, 4h, 7h e 10h, as quais foram transferidas para tubos de 0,5 mL previamente heparinizados. Para os animais previamente tratados com 17α -et β nil estradiol e propilenoglicol, o período total de coleta foi de 4 horas.

Os animais foram sacrificados 24 h após a administração das emulsões ou da LDL, quando foram separados os órgãos: adrenais, baço, coração, fígado, pulmões e rins, bem como alíquotas do intestino delgado e dos tecidos adiposo e muscular que foram imediatamente colocados em solução de NaCl 0,9% gelada.

3.5.3. Processamento das amostras de sangue ⁽⁴⁰⁾

As amostras de sangue recém-colhidas foram centrifugadas a 1.500 rpm por 10 min. Alíquotas de 0,1 mL de plasma foram submetidas à extração dos lipídeos em metanol:clorofórmio:água (2,5:5,0:2,5 v/v) por uma noite a 4°C. A fase orgânica (4,5 mL) foi separada e seca sob fluxo de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL da solução padrão (20 μ g de oleato de colesterol e 20 μ g de trioleína) a cada extrato, submetido, então, à separação cromatográfica em camada delgada (sílica gel 60H, 0,5 mm de espessura), com sistema solvente contendo hexana:éter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v). Após caracterização das frações lipídicas em vapor de iodo metálico, as frações correspondentes aos ésteres de colesterol, triacilgliceróis e fosfolipídeos foram transferidas para frascos de cintilação, aos quais adicionaram-se 7 mL de solução cintiladora (5g PPO, 0,5 g POPOP, 333 mL de Triton X-100 e tolueno q.s.p. 1000 mL).

A radioatividade das frações foi medida nos canais de ^3H e ^{14}C utilizando-se um espectrômetro LKB mod. 1211 RACKBETA (Wallac, Finlândia) e foi utilizada para estimar a taxa fracional de remoção plasmática de cada lipídeo constituinte da emulsão.

3.5.4. Processamento das amostras de órgãos⁽⁴⁰⁾

As alíquotas dos órgãos (cerca de 1 g) foram submetidas à homogeneização em triturador de tecidos Marconi mod. TE102 (Piracicaba, São Paulo). Em seguida, os lipídeos de cada alíquota foram submetidos a extração, em 10 mL de metanol e 20 mL de clorofórmio, por uma noite a 4°C. A seguir, os extratos foram filtrados (papel de filtro Whatman nº 1), e os resíduos presentes nos tubos e filtros foram lavados com mais 5 mL de clorofórmio. Sete mL de água destilada foram adicionados a cada filtrado, que foi mantido em repouso por uma noite a 4°C. A seguir, a fase superior (aquosa) foi descartada e à fase inferior adicionou-se 4 mL da solução constituída de clorofórmio:metanol:água destilada (3:48:47, v/v), mantendo-se em repouso por uma noite a 4°C. A fase superior (aquosa) foi descartada e a inferior foi seca sob fluxo de nitrogênio. Após a secagem, acrescentou-se ao resíduo 0,5 mL da solução de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e uma alíquota de 0,2 mL foi submetida a cromatografia em camada delgada, nas mesmas condições que as das amostras de plasma.

As frações correspondentes aos ésteres de colesterol foram transferidas para frascos de cintilação para a determinação da radioatividade do éter oleico de [^3H]-

colesterol. Os dados foram utilizados para os cálculos da distribuição percentual das emulsões em cada órgão.

3.6. Incubação das emulsões com a HDL de rato

3.6.1. Isolamento da HDL e das apolipoproteínas da HDL

A fração HDL foi isolada e purificada a partir do plasma de 50 ratos⁽⁷⁷⁾. Uma alíquota contendo 10 mg de proteínas foi liofilizada e submetida a remoção dos lipídeos⁽¹²⁵⁾. A seguir, foi ressuspendida em 2 mL de tampão TRIS-HCl 0,01 M (pH 8,0), constituindo a fração apo-HDL.

3.6.2. Incubação das emulsões com a HDL e apo-HDL

Alíquotas das emulsões com e sem apo B foram incubadas com as frações HDL ou apo-HDL, mantendo-se a relação de 1 mg de colesterol da emulsão para 5 mg de proteínas da HDL (ou de apo-HDL), em um volume final de 2,0 mL. A incubação foi realizada em banho de água a 37°C, por 2 h, sob agitação (Banho de água tipo Dubnoff, Fanen, São Paulo).

A seguir, completou-se o volume de cada incubação para 10 mL com tampão TRIS-HCl 0,01 M (pH 8,0), ajustou-se a densidade para 1,050 g/mL pela adição de KBr sólido e submeteu-se à ultracentrifugação (Centrífuga Hitachi mod. 70P-72, rotor RBP 40T, Tokio, Japão) a 39.000 rpm, por 24 h a 4°C. Retirou-se 1 mL de cada sobrenadante que foi dialisado em 4 litros de tampão TRIS-HCl 0,01 M (pH 8,0), por 24 h, a 4°C.

As frações obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, para a separação e caracterização das apolipoproteínas adsorvidas às emulsões⁽¹²⁰⁾. A

quantificação das apo E e apo Cs foi realizada por densitometria (Densitômetro FLUR-VIS, Helena Laboratories, Texas, EUA).

3.7. Análise dos dados

3.7.1. Estimativa da taxa fracional de remoção plasmática

A taxa fracional de remoção plasmática (TFR) foi estimada, para cada lipídeo, segundo o método descrito por MATTHEWS⁽¹⁰⁸⁾, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$TFR = \frac{1}{\frac{a_1}{b_1} + \frac{a_2}{b_2}},$$

onde os parâmetros a_1 , a_2 , b_1 e b_2 foram estimados pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se o programa STATGRAPHICS, a partir da radioatividade detectada no plasma dos animais nos vários períodos de tempo, segundo a função:

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

onde y representa o decaimento da radioatividade no plasma em função do tempo (t).

3.7.2. Cálculo da distribuição da radioatividade nos órgãos

A distribuição percentual do éster de colesterol das emulsões em cada órgão foi obtida a partir da relação entre a radioatividade do éter oleico de [3H]-colesterol detectada na

alíquota de órgão e a radioatividade total injetada no animal no início do experimento. A massa total do intestino delgado e dos tecidos adiposo e muscular foi calculada segundo a descrição de CASTER e cols.⁽¹⁷⁾.

3.8. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos utilizou-se o teste t de "student"⁽¹⁴⁾.

RESULTADOS

1. Composição das emulsões

Os dados relativos à composição química das emulsões estão expostos na Tabela 1. A emulsão com apo B apresentou menor teor de colesterol total (CT = $24,8 \pm 7,3$ %) e triacilgliceróis (TG = $1,2 \pm 0,4$ %) e maior teor de fosfolipídeos (FL = $65,4 \pm 11,2$ %) que a emulsão sem apo B (CT = $28,1 \pm 4,0$ %, TG = $2,6 \pm 0,9$ %, FL = $69,0 \pm 4,5$ %), entretanto essa diferença foi significativa apenas para o teor de triacilgliceróis.

2. Remoção plasmática das emulsões

As TFR das emulsões sem apo B marcadas tanto com [^{14}C]-oleato de colesterol e quanto com éter oleico de [^3H]-colesterol são mostradas na Tabela 2. Como se observa, não houve diferença entre a remoção plasmática dos dois traçadores, o que comprova a semelhança de comportamento metabólico dos mesmos (Figura 1).

Na Tabela 3 e Figuras 2, 3 e 4 vemos que a remoção plasmática dos lipídeos da emulsão sem apo B foi mais rápida do que a dos lipídeos da emulsão com apo B. Também foi mais rápida a remoção do éster de colesterol da emulsão sem apo B comparada com a do éster de colesterol da LDL. Portanto a presença da apo B tanto na emulsão quanto na lipoproteína tende a retardar a remoção das partículas. É de se notar que não

houve diferença entre a TFR do éster de colesterol da emulsão com apo B e a da LDL.

3. Captação das emulsões pelos órgãos

A captação das emulsões marcadas com o [3 H]-éter oleico de colesterol ([3 H]-CE) pelos órgãos dos ratos, 24 horas após a injeção, é mostrada na Tabela 4 e Figura 5. O fígado foi o principal órgão de captação tanto das emulsões quanto da LDL, mas o maior valor de captação hepática foi o da emulsão sem apo B ($48,64 \pm 5,05$). A associação da apo B à emulsão fez com que diminuísse a captação hepática e aumentasse a captação esplênica. Não houve diferenças estatisticamente significantes com relação aos demais órgãos (Tabela 4 e Figura 5).

Comparada com a LDL, a captação hepática da emulsão sem apo B foi maior, assim como a captação pelas adrenais (Tabela 4). No entanto, o baço, os pulmões e os rins captaram mais a LDL do que a emulsão sem apo B.

A captação hepática da emulsão com apo B foi semelhante à da LDL, mas a captação desta emulsão foi maior pelas adrenais e menor pelo baço, pulmões e rins (Tabela 4).

Os dados percentuais de captação das emulsões e da LDL calculados por g de órgão são apresentados na Tabela 5 e Figura 6. Nesta abordagem, o tecido que exibiu os maiores valores de captação das emulsões, independente destas conterem ou não apo B, foi o adrenal, seguido pelo hepático, apresentando metade da captação adrenal.

4. Tratamento com 17 α -etinil estradiol

4.1. Lipídeos plasmáticos

Na Tabela 6 constam os níveis plasmáticos dos lipídeos dos animais tratados com 17 α -etinil estradiol (17-EE). Verifica-se que esses valores encontram-se diminuídos após tratamento com o estrógeno.

4.2. Remoção plasmática das emulsões

Na Tabela 7 são mostrados os valores de TFR dos lipídeos da emulsão com apo B, bem como do [14 C]-CO da emulsão sem apo B, dos ratos tratados com 17-EE e controle. A remoção plasmática de cada lipídeo é mostrada nas Figuras 7, 8, 9 e 10.

A TFR dos lipídeos da emulsão com apo B nos animais tratados com 17-EE foi duas vezes maior maior que nos animais controles (Tabela 7). O tratamento com 17-EE também promoveu um aumento significativo na remoção do éster de colesterol da emulsão sem apo B. No grupo controle a TFR do éster de colesterol da emulsão sem apo B foi aproximadamente 50% maior que a da emulsão com apo B, semelhante ao dos animais não tratados (Tabela 3). Nos animais tratados com 17-EE, essa diferença foi acentuada (aproximadamente duas vezes maior).

4.3. Captação da emulsão com apo B pelos órgãos

Na Tabela 8 e Figuras 11 e 12 é mostrada a distribuição da emulsão com apo B pelos pelos órgãos dos animais tratados com 17 α -etinil estradiol e controles.

O tratamento com o estrógeno aumentou a captação da emulsão com apo B pelo tecido hepático e dos outros tecidos com excessão do adiposo, intestinal e renal (Tabela 8, Figura 11). A captação da emulsão com apo B por grama de órgão também foi maior para as adrenais, o baço, o coração, os pulmões e o músculo dos animais tratados com 17-EE (Tabela 8 e Figura 12).

5. Incubação das emulsões com HDL de rato

Após a incubação das emulsões com as frações HDL ou apo-HDL observou-se que a emulsão sem apo B adsorveu a apo E em maior proporção que a emulsão com apo B (Tabela 9). Por outro lado, as apoCs foram adsorvidas em maior proporção pela emulsão com apo B. Em consequência, a relação apoE/apoCs da emulsão sem apo B foi cerca de 60% maior que aquela da emulsão com apo B.

Tabela 1: Composição química percentual das emulsões com e sem apo B, após a purificação.*

EMULSÕES	CONSTITUINTES			
	CT	TG	FL	PT
SEM APO B (n=5)	28,1 ± 4,0	2,6 ± 0,9	69,0 ± 4,5	-
COM APO B (n=5)	24,8 ± 7,3	1,2 ± 0,4*	65,4 ± 11,2	8,6 ± 4,5

* MÉDIA ± D.P.

* = p < 0,05

CT = colesterol total

TG = triacilgliceróis

FL = fosfolipídeos

PT = proteínas

Tabela 2: Remoção plasmática do éter oleico de [^3H]-colesterol ([^3H]-CE) e do [^{14}C]-oleato de colesterol ([^{14}C]-CO) da emulsão sem apo B, injetada intra-arterialmente em ratos.*

EMULSÃO	TAXA FRACIONAL DE REMOÇÃO (TFR, h^{-1})	
	[^3H]-CE	[^{14}C]-CO
SEM APO B	$0,56 \pm 0,13$ (n=10)	$0,55 \pm 0,08$ (n=19)

* MÉDIA $\pm$ D.P.

Tabela 3: Remoção plasmática do éter oleico de [^3H]-colesterol ([^3H]-CE), do tri-[^3H]-oleato de glicerol ([^3H]-TG) e da fosfatidil-[^3H]-colina ([^3H]-FL) das emulsões com e sem apo B e da LDL natural, injetadas intra-arterialmente em ratos.*

GRUPOS	TAXA FRACIONAL DE REMOÇÃO (TFR, h^{-1})		
	[^3H]-CE	[^3H]-TG	[^3H]-FL
SEM APO B (n=10)	$0,56 \pm 0,13$	$1,16 \pm 0,26$	$0,81 \pm 0,16$
COM APO B (n=15)	$0,40 \pm 0,08^{*1}$	$0,89 \pm 0,12^{*1}$	$0,64 \pm 0,21^{*2}$
LDL NATURAL (n=4)	$0,33 \pm 0,09^{*1}$	-	-

* MÉDIA $\pm$ D.P.

* = comparado com a emulsão sem apo B

*1 = $p < 0,01$

*2 = $p < 0,05$

Tabela 4. Captação do éter oleico de [3 H]-colesterol ([3 H]-CE) das emulsões com e sem apo B e da LDL natural pelos órgãos, 24 h após a injeção intra-arterial, em ratos.*

ORGÃOS	CAPTAÇÃO (% da Dose Injetada)		
	EMULSÕES		LDL NATURAL (n=3)
	SEM APO B (n=10)	COM APO B (n=8)	
Adrenais	0,58 $\pm$ 0,21	0,55 $\pm$ 0,07	0,25 $\pm$ 0,09 ^{a3.b1}
Adiposo	2,18 $\pm$ 1,32	2,79 $\pm$ 0,95	1,61 $\pm$ 0,14
Baço	0,95 $\pm$ 0,31	1,38 $\pm$ 0,30 ^{a2}	2,54 $\pm$ 0,44 ^{a1.b1}
Coração	0,15 $\pm$ 0,11	0,17 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,08
Fígado	48,64 $\pm$ 5,05	43,34 $\pm$ 4,78 ^{a3}	39,35 $\pm$ 9,19 ^{a3}
Intestino	0,53 $\pm$ 0,20	0,54 $\pm$ 0,24	0,88 $\pm$ 0,41
Músculo	3,14 $\pm$ 1,47	4,14 $\pm$ 1,95	4,73 $\pm$ 0,40
Pulmões	0,23 $\pm$ 0,10	0,26 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,43 ^{a1.b1}
Rins	0,20 $\pm$ 0,12	0,25 $\pm$ 0,07	0,43 $\pm$ 0,16 ^{a3.b2}

* MÉDIA $\pm$ D.P.

^a = comparado com a emulsão sem apo B

^{a1} = p < 0,001

^{a2} = p < 0,01

^{a3} = p < 0,05

^b = comparado com a emulsão com apo B

^{b1} = p < 0,001

^{b2} = p < 0,05

Tabela 5. Captação do éter oleico de [3H]-colesterol ([3H]-CE) das emulsões com e sem apo B e da LDL natural por g de órgão, 24 h após a injeção intra-arterial, em ratos.*

ORGÃOS	CAPTAÇÃO (% da Dose Injetada por g de órgão)		
	EMULSÕES		LDL NATURAL (n=3)
	SEM APO B (n=10)	COM APO B (n=8)	
Adrenais	10,65 ± 4,63	9,01 ± 1,90	2,98 ± 1,09 ^{a3, b1}
Adiposo	0,13 ± 0,08	0,16 ± 0,05	0,07 ± 0,01 ^{b3}
Baço	1,82 ± 2,00	2,00 ± 0,63	3,65 ± 0,86 ^{a2, b2}
Coração	0,18 ± 0,12	0,20 ± 0,07	0,11 ± 0,07
Fígado	5,22 ± 0,93	4,65 ± 1,30	3,41 ± 1,04 ^{a3}
Intestino	0,14 ± 0,05	0,14 ± 0,07	0,19 ± 0,08
Músculo	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Pulmões	0,19 ± 0,07	0,21 ± 0,05	0,66 ± 0,23 ^{a1, b1}
Rins	0,10 ± 0,06	0,14 ± 0,03	0,17 ± 0,06

* MÉDIA ± D.P.

^a = comparado com a emulsão sem apo B

^{a1} = p < 0,001

^{a2} = p < 0,01

^{a3} = p < 0,02

^b = comparado com a emulsão com apo B

^{b1} = p < 0,001

^{b2} = p < 0,01

^{b3} = p < 0,02

Tabela 6: Níveis plasmáticos dos lipídeos dos ratos tratados com 17 α -etinil estradiol (17-EE) e controle.*

LIPÍDEOS (mg/dL)	GRUPOS	
	CONTROLE (n=3)	17-EE (n=5)
COLESTEROL	53,2 $\pm$ 7,4	17,4 $\pm$ 2,3 ^a
TRIGLICERÍDEOS	92,5 $\pm$ 9,2	43,6 $\pm$ 28,4 ^b
FOSFOLIPÍDEOS	342,0 $\pm$ 21,8	226,9 $\pm$ 22,6 ^a

* MÉDIA $\pm$ D.P.

^a = p < 0,01

^b = p < 0,05

Tabela 7: Remoção plasmática do éter oleico de [^3H]-colesterol ([^3H]-CE), do tri-[^3H]-oleato de glicerol ([^3H]-TG), da fosfatidil-[^3H]-colina ([^3H]-FL) da emulsão com apo B de rato e do [^{14}C]-oleato de colesterol ([^{14}C]-CO) da emulsão sem apo B, injetadas intra-arterialmente em ratos tratados com 17 α -etinil estradiol (17-EE) e controle.*

GRUPOS	TAXA FRACIONAL DE REMOÇÃO (TRF, h^{-1})			
	EMULSÃO COM APO B		EMULSÃO SEM APO B	
	[^3H]-CE	[^3H]-TG	[^3H]-FL	[^{14}C]-CO
CONTROLE (n=3)	0,42 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,08	0,67 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,12 ^{b2}
17-EE (n=7)	0,96 $\pm$ 0,25 ^{a1}	2,25 $\pm$ 0,82 ^{a2}	1,20 $\pm$ 0,26 ^{a2}	1,94 $\pm$ 0,81 ^{a3, b1}

* MÉDIA $\pm$ D.P.

^a = comparado com o grupo controle

^{a1} = $p < 0,01$

^{a2} = $p < 0,02$

^{a3} = $p < 0,05$

^b = comparado com [^3H]-CE da emulsão com apo B

^{b1} = $p < 0,01$

^{b2} = $p < 0,05$

Tabela 8. Captação do éter oleico de [3 H]-colesterol ([3 H]-CE) da emulsão com apo B pelos órgãos (total e por g de órgão), 24 h após a injeção intra-arterial, em ratos tratados com 17 α -etinil estradiol (17-EE) e controle.*

ORGÃOS	CAPTAÇÃO			
	% da Dose Injetada		% D.I. por g de Órgão	
	CONTROLE (n=10)	17-EE (n=5)	CONTROLE (n=10)	17-EE (n=5)
Adrenais	0,55 $\pm$ 0,07	1,42 $\pm$ 0,51 ^{a1}	9,01 $\pm$ 1,90	20,45 $\pm$ 4,41 ^{a1}
Adiposo	2,79 $\pm$ 0,95	3,47 $\pm$ 0,84	0,16 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,05
Baço	1,38 $\pm$ 0,30	2,50 $\pm$ 0,37 ^{a1}	2,00 $\pm$ 0,63	2,83 $\pm$ 0,59 ^{a4}
Coração	0,17 $\pm$ 0,06	0,37 $\pm$ 0,08 ^{a1}	0,20 $\pm$ 0,07	0,42 $\pm$ 0,09 ^{a1}
Fígado	43,34 $\pm$ 4,78	50,20 $\pm$ 2,17 ^{a3}	4,65 $\pm$ 1,30	4,27 $\pm$ 0,48
Intestino	0,54 $\pm$ 0,44	0,44 $\pm$ 0,11	0,14 $\pm$ 0,07	0,12 $\pm$ 0,02
Músculo	4,14 $\pm$ 1,95	6,82 $\pm$ 1,03 ^{a3}	0,04 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01 ^{a2}
Pulmões	0,26 $\pm$ 0,07	0,43 $\pm$ 0,11 ^{a1}	0,21 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,08 ^{a4}
Rins	0,25 $\pm$ 0,07	0,28 $\pm$ 0,05	0,14 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,02

* MÉDIA $\pm$ D.P.

^a = comparado com o grupo controle

^{a1} = p < 0,001

^{a2} = p < 0,01

^{a3} = p < 0,02

^{a4} = p < 0,05

Tabela 9: Valores percentuais das apolipoproteínas apo E e apo Cs e de proteínas totais adsorvidas às emulsões, após incubação com a fração HDL e a fração apoHDL.*

INCUBAÇÕES (n=3)	PROTEÍNAS (µg/mL)	APOLIPOPROTEÍNAS (%)		RELAÇÃO ApoE/ApoCs
		ApoE	ApoCs	
EMULSÃO SEM APO B				
(1) HDL	313 ± 15	44 ± 12	56 ± 12	0,84 ± 0,40
(2) ApoHDL	330 ± 10	45 ± 3	55 ± 3	0,82 ± 0,10
EMULSÃO COM APO B				
(3) HDL	200 ± 10 ^{a1b1}	30 ± 8 ^{b2}	70 ± 8 ^{b2}	0,44 ± 0,16 ^{b2}
(4) ApoHDL	360 ± 10 ^{a2}	36 ± 4 ^{b2}	64 ± 4 ^{b2}	0,57 ± 0,09 ^{b2}

* = MÉDIA $\pm$ D.P.

^a = comparado com a incubação (1)

^{a1} = $p < 0,001$

^{a2} = $p < 0,02$

^b = comparado com a incubação (2)

^{b1} = $p < 0,0001$

^{b2} = $p < 0,05$

Figura 1: Remoção plasmática do éter oleico de [^3H]-colesterol ([^3H]-ETER) e do [^{14}C]-oleato de colesterol ([^{14}C]-ESTER) da emulsão sem apo B injetada intra-arterialmente em ratos.

Figura 2: Remoção plasmática do éster oleico de $[^3\text{H}]$ -colesterol (traçador do éster de colesterol) das emulsões com e sem apo B e da LDL natural, injetadas intra-arterialmente em ratos.

Figura 3: Remoção plasmática do tri- $[^3\text{H}]$ -oleato de glicerol (traçador dos triacilgliceróis) das emulsões com e sem apo B, injetadas intra-arterialmente em ratos.

Figura 4: Remoção plasmática da fosfatidil-[³H]-colina (traçador dos fosfolípidos) das emulsões com e sem apo B, injetadas intra-arterialmente em ratos.

Figura 5: Representação gráfica da captação do éter oleico de $[^3\text{H}]$ -colesterol das emulsões com e sem apo B e da LDL natural pelos órgãos, 24 h após a injeção intra-arterial, em ratos.

CAPTACAO PELOS ORGAOS

Figura 6: Representação gráfica da captação do éter oleico de $[^3\text{H}]$ -colesterol das emulsões com e sem apo B e da LDL natural por g de órgão, 24 h após a injeção intra-arterial, em ratos.

Figura 7: Remoção plasmática do éter oleico de [^3H]-colesterol (traçador do éster de colesterol) da emulsão com Apo B, injetada intra-arterialmente em ratos tratados com 17α -etinizil estradiol (17-EE) e controle.

APO B-EMULSAO

Figura 8: Remoção plasmática do tri- $[^3\text{H}]$ -oleato de glicerol (traçador dos triacilgliceróis) da emulsão com Apo B, injetada intra-arterialmente em ratos tratados com 17α -etinil estradiol (17-EE) e controle.

Figura 9: Remoção plasmática da fosfatidil- $[^3\text{H}]$ -colina (traçador dos fosfolipídeos) da emulsão com Apo B, injetada intra-arterialmente em ratos tratados com 17α -etinil estradiol (17-EE) e controle.

Figura 10: Remoção plasmática do [^{14}C]-oleato de colesterol (traçador do éster de colesterol) da emulsão sem Apo B, injetada intra-arterialmente em ratos tratados com 17α -etinil estradiol (17-EE) e controle.

Figura 11: Representação gráfica da captação do éter oleico de $[^3\text{H}]$ -colesterol da emulsão com Apo B pelos órgãos, 24 h após a injeção intra-arterial, em ratos tratados com 17 α -etinil estradiol (17-EE) e controle.

CAPTACAO PELOS ORGAOS
EMULSAO COM APO B

Figura 12: Representação gráfica da captação do éter oleico de $[^3\text{H}]$ -colesterol da emulsão com Apo B por g de órgão, 24 h após a injeção intra-arterial, em ratos tratados com 17 α -etinil estradiol (17-EE) e controle.

DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado que o comportamento metabólico das emulsões lipídicas pode ser semelhante ao das lipoproteínas naturais^(97,126,133). Quando essas partículas são injetadas na circulação sistêmica de ratos, trocam elementos de superfície com as lipoproteínas circulantes, adquirindo as apolipoproteínas que modulam o seu metabolismo e favorecem a sua remoção do compartimento plasmático^(22,103,133).

Estudando o comportamento metabólico de emulsões de composição semelhante à fase lipídica da LDL, CÉSAR⁽²¹⁾ observou que essas emulsões acompanharam as etapas do metabolismo das LDL, em ratos. Os dados de remoção plasmática dessas partículas se ajustaram à combinação de duas componentes exponenciais. A primeira foi associada com a remoção das partículas de menor densidade, de forma análoga à remoção das LDL leves. A segunda foi relacionada com a remoção plasmática das partículas mais densas, que se formaram no compartimento vascular. Aparentemente as emulsões foram removidas apenas por mediação dos receptores B,E, ou seja, os receptores que captam as LDL o que foi evidenciado em estudos de competição⁽²¹⁾. Esses resultados deram base ao presente trabalho.

Para a interpretação dos nossos dados, é importante frisar que no rato o éster de colesterol não sai das partículas de LDL ou de emulsão enquanto estas circulam no plasma, pois a atividade da proteína de transferência do éster de colesterol

neste animal é mínima⁽³²⁾. Portanto, em nossas condições experimentais, o decaimento plasmático desse lipídeo corresponde ao decaimento plasmático das próprias partículas da emulsão ou da LDL.

A remoção plasmática da emulsão sem apo B, medida pela TFR do éster de colesterol, foi maior que a da emulsão com apo B e a da LDL (Tabela 3). Isto aconteceu provavelmente devido a diferenças no elenco de apolipoproteínas na superfície das partículas: enquanto a apo B é o principal componente da emulsão com apo B e da LDL, a emulsão sem apo B pode adquirir várias apolipoproteínas plasmáticas com exceção da própria apo B^(21,152).

Realmente, a incubação de emulsões de composição semelhante à fase lipídica da LDL com as HDL de rato, lipoproteínas abundantes no plasma desse animal, mostrou que as partículas artificiais adquirem uma gama de apolipoproteínas, entre elas a apo E, que é o componente essencial para o reconhecimento das partículas por receptores de membranas celulares⁽²¹⁾. Vários autores mostraram que emulsões com diferente composição lipídica, bem como vesículas de fosfolipídeos, têm a capacidade de adsorver a apo E *in vitro*^(42,69,114). Essas partículas enriquecidas de apo E apresentaram alta capacidade de ligação aos receptores B,E de fibroblastos, os quais promoveram o catabolismo das partículas artificiais.

MAHLEY e INNERARITY⁽⁹⁹⁾ demonstraram que os receptores B,E apresentam alta afinidade por lipoproteínas

ricas em apo E. Utilizando a HDL rica em apo E (HDL_c), esses autores verificaram que o alto grau de afinidade resulta de múltiplas ligações entre as moléculas de apo E presentes na superfície da partícula e o receptor B,E. Em outro estudo, verificou-se que vesículas de fosfolipídeos com a apo E associada (com 4 moléculas de apo E ativas) ligaram-se aos receptores B,E com a mesma afinidade da HDL_c^{'129'}. A diminuição do número de moléculas ativas na partícula foi acompanhada de diminuição da afinidade. Na presença de uma molécula de apo E ativa, a afinidade da partícula pelos receptores foi equivalente à das LDL.

FUNAHASHI e cols.^{'42'} verificaram que a capacidade de ligação da emulsão constituída de fosfolipídeos, triacilgliceróis e apo E com os receptores B,E foi proporcional ao número de moléculas de apo E das partículas. A capacidade máxima de ligação foi obtida com 4 moléculas de apo E por partícula de emulsão. Nessa condição a emulsão ligou-se ao receptor B,E com maior afinidade que a da própria LDL.

O fato da emulsão sem apo B ter sido removida do plasma com maior velocidade que a emulsão com apo B e a LDL pode ser, portanto, atribuída à maior afinidade dos receptores B,E celulares pelas moléculas de apo E existentes em maior número na primeira, após a injeção na corrente sanguínea, conforme indicam os experimentos de incubação (Tabela 9), discutidos adiante.

LUNDBERG e SUOMINEN^{'97'}, utilizando um modelo de emulsão associada com a apo B humana, demonstraram que as

partículas da emulsão apresentaram capacidade de ligação aos receptores B,E de fibroblastos humanos semelhante à da LDL. Portanto, é de se esperar que a presença da apo B de rato na partícula de emulsão implique na sua saída do compartimento plasmático numa taxa semelhante a da LDL, o que de fato foi observado neste trabalho.

Embora os receptores B,E de fibroblastos tenham alta afinidade pelas lipoproteínas que contêm apo B, a afinidade por partículas ricas em apo E é significativamente maior^(49,50). Isso implica em que a emulsão com apo B seja captada por mediação dos receptores B,E celulares de forma menos eficiente que a emulsão sem apo B, permanecendo por mais tempo no compartimento plasmático.

É importante salientar que os dois tipos de emulsão adsorveram várias apolipoproteínas quando incubadas com as frações HDL ou apo-HDL, principalmente as apo E e apo Cs. Entretanto, as partículas da emulsão com apo B adquiriram menos apo E e mais apo Cs que as da emulsão sem apo B (Tabela 9). Foi observado que as apo Cs presentes nas lipoproteínas ricas em triacilgliceróis (quilomícrons e VLDL) inibem a capacidade de ligação da apo E aos receptores celulares enquanto ativam a lipase lipoprotéica⁽¹⁵⁾. No metabolismo das VLDL, por exemplo, as partículas remanescentes que contêm maior quantidade de apo C são menos eficientemente captadas pelo fígado, permanecendo mais tempo no plasma e portanto sendo mais facilmente transformadas em LDL⁽⁵¹⁾. A relação apoE/apoCs das lipoproteínas parece, então, ter importância fundamental no

destino metabólico da partícula⁽⁵⁷⁾. Nesse sentido, a menor relação apoE/apoCs da emulsão com apo B provavelmente também contribui para a menor capacidade de ligação das partículas dessa emulsão aos receptores B,E celulares, em comparação com a emulsão sem apo B, retardando a sua remoção plasmática.

A participação dos receptores B,E na remoção das partículas de emulsão pôde ser evidenciada com clareza na experiência do tratamento dos animais com 17 α -etinil estradiol. Como vimos, esse estrógeno, quando administrado em doses farmacológicas a ratos, induz o aumento do número de receptores B,E hepáticos^(23,149). Esse efeito provoca o aumento da taxa de remoção plasmática das LDL, bem como a redução dos níveis séricos dos lipídeos^(8,58). No presente trabalho, os animais tratados com 17 α -etinil estradiol apresentaram hipolipemia importante como esperado, sendo que os níveis plasmáticos de colesterol sofreram uma redução acentuada (Tabela 6).

A TFR do éster de colesterol das emulsões foi significativamente maior nos animais tratados com 17 α -etinil estradiol, demonstrando que os receptores B,E celulares são os responsáveis pela saída das partículas artificiais do compartimento plasmático (Tabela 7). Entretanto, esse efeito foi acentuado quando a emulsão não continha apo B. Estes resultados evidenciam que a afinidade dos receptores B,E por esta emulsão é de fato maior que pela emulsão com apo B.

Nos estudos de captação das emulsões pelos órgãos utilizou-se o éter oleico de colesterol ([³H]-CE) para marcação

das partículas. Esse lipídeo tem comportamento físico-químico semelhante ao éster de colesterol. Como podemos observar na Tabela 2, a TFR desse isótopo foi semelhante à do oleato de colesterol ($[^{14}\text{C}]\text{-CO}$), o que reflete a similaridade de comportamento metabólico no plasma. Entretanto, o éter de colesterol, diferentemente do éster, não sofre a ação de enzimas lisossomais após a captação da partícula pela célula, acumulando-se nos tecidos^(153,154). Dessa forma, este lipídeo é o indicador mais apropriado da captação cumulativa da partícula pelos órgãos.

Os dados de captação mostraram que, de maneira geral, houve um perfil de distribuição das emulsões e da LDL pelos órgãos em comum (Figura 5), o que se constitui em uma evidência importante de que as partículas artificiais e as naturais partilham os mesmos caminhos metabólicos. As partículas foram captadas principalmente pelo fígado, como esperado pelos dados sobre LDL descritos na literatura, e em menor proporção pelos tecidos muscular, adiposo e esplênico^(8,55,130,154). Os demais órgãos apresentaram quantidades mínimas de captação do éter oleico de colesterol das emulsões e da LDL. É de se notar que as emulsões apresentaram captação hepática maior que a LDL, havendo pois a tendência das partículas de LDL distribuírem-se mais pelos tecidos extra-hepáticos que as partículas artificiais.

O fato da captação hepática da emulsão sem apo B ter sido maior que a da emulsão com apo B e a da LDL provavelmente se deve à alta afinidade dos receptores B,E hepáticos pela apo

E, que está presente em maior quantidade na emulsão sem apo B. Esse efeito pôde ser evidenciado quando se estimou a captação das emulsões e da LDL por g de tecido hepático (Tabela 5). É de se notar que a maior capacidade de degradação das emulsões foi observada nas adrenais que continham cerca de 10% de éter oleico de colesterol por g de tecido, correspondendo ao dobro do valor encontrado no fígado.

A maior captação da emulsão com apo B pelos órgãos dos animais tratados com 17 α -etinil estradiol, em comparação com os controles, é coerente com o fato do número de receptores B,E estar aumentado após o tratamento com esse estrógeno (tabela 8). Isto indica que a emulsão com apo B foi captada pelos tecidos, por mediação dos receptores B,E celulares, de forma semelhante à LDL^(9,11a). Esse efeito foi evidenciado pela captação da emulsão por g de tecido, que aumentou em vários órgãos principalmente nas adrenais. Entretanto, é interessante notar que a captação hepática, calculada por g de órgão não tenha aumentado nos animais tratados com o estrógeno. Esse fato pode estar relacionado com o aumento do catabolismo hepático: o tratamento estrogênico aumenta a excreção do colesterol na bile; portanto, é possível que uma parte do colesterol captado em maior quantidade pelo fígado na vigência deste tratamento tenha sido eliminado por via biliar, daí não havermos registrado o aumento de captação por g de tecido hepático^(85,99,11a).

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que a presença de apo B na LDL determina uma cinética plasmática mais

lenta da lipoproteína, provavelmente por diminuir a afinidade da partícula pelo receptor B,E, comparado a outra via possível de ligação ao receptor, ou seja, a interação com a apo E. Os nossos dados sugerem que o modelo de emulsões semelhantes à fase lipídica da LDL, com a apo B associada à sua estrutura, seja um instrumento eficiente para estudar as vias metabólicas desta lipoproteína, em especial os mecanismos que a removem do plasma.

CONCLUSÕES

1. A incorporação da apolipoproteína B (apo B) às emulsões retardou a remoção plasmática e diminuiu a captação hepática das partículas, no rato.
2. A emulsão com apo B foi removida do compartimento plasmático numa taxa semelhante à da LDL.
3. As partículas de emulsão com apo B adquiriram menos apo E e mais apo Cs que a emulsão sem apo B in vitro.
4. Confirmou-se in vivo os achados in vitro de que a apo E tem maior afinidade pelos receptores B,E celulares do que a apo B, quando associada a partículas lipoprotéicas.
5. O modelo das emulsões análogas à LDL mostrou-se um instrumento eficiente no estudo do metabolismo daquela lipoproteína.

RESUMO

A LDL constitui-se de uma fase lipídica, uma esfera composta principalmente de um núcleo de colesterol esterificado envolto por uma camada de fosfolipídeos. A fase lipídica junta-se uma única molécula proteica, a apolipoproteína B (apo B). A LDL é removida da circulação por mediação de receptores específicos, os receptores B,E, que reconhecem não só a apo B da LDL mas também a apo E, que está presente em outras lipoproteínas. Estudou-se neste trabalho a influencia da apo B no metabolismo da LDL, através de um modelo de emulsões semelhantes à fase lipídica da LDL, constituídas de oleato de colesterol (29%), fosfatidilcolina (69%) e trioleína (2%), preparadas por sonicação, seguida de ultracentrifugação. As emulsões, com seus componentes lipídicos marcados isotopicamente, foram associadas à apo B e injetadas no rato, determinando-se sua remoção plasmática e captação pelos diversos órgãos do animal. Os resultados foram comparados com o metabolismo da emulsão sem associação da apo B à sua estrutura e com o da LDL natural.

Verificou-se que a presença de apo B retardou a remoção plasmática das partículas da emulsão. Por outro lado, o oleato de colesterol da emulsão com apo B foi removido do compartimento plasmático numa taxa semelhante à da LDL natural, o que demonstra a adequação do modelo utilizado à situação fisiológica. Tanto as emulsões quanto a LDL natural foram captadas principalmente pelo fígado. Entretanto, a captação

hepática da emulsão sem apo B foi maior que a da emulsão com apo B e a da LDL. A incubação das emulsões com HDL do plasma de rato mostrou que a emulsão sem apo B adquiriu mais apo E que a emulsão com apo B. Portanto, essas diferenças de comportamento metabólico provavelmente se devem à maior afinidade dos receptores B,E hepáticos por partículas que contêm mais apo E, em comparação às que contêm a apo B.

O aumento da atividade dos receptores B,E, induzido pelo tratamento com 17α -etinil estradiol, resultou no aumento da cinética plasmática das duas emulsões. Porém, a taxa de remoção plasmática da emulsão sem apo B também foi maior no grupo tratado com o estrógeno.

Esses dados indicam que as emulsões com apo B associada à sua estrutura apresentam comportamento metabólico muito semelhante ao da LDL. Portanto, o modelo das emulsões análogas à LDL parece ser um instrumento eficiente no estudo do metabolismo daquela lipoproteína.

ABSTRACT

The effects of apolipoprotein B (apo B) on the metabolism of emulsions constituted of cholesteryl oleate (29%), phosphatidylcholine (69%) and triolein (2%) were studied in rats. After intra-arterial injection of the radiolabelled emulsions, plasma removal of the emulsions was reduced in presence of apo B. On the other hand, the cholesteryl ester moiety of the apo B emulsion was removed at the same rate as native LDL. Emulsions and LDL were taken up mainly by the liver 24 h after the injection. However, the hepatic uptake of the apo B emulsion was similar to LDL and lower than that of the apo B-free emulsion. These differences in metabolic behaviour were probably due to the lower hepatic B,E receptor affinity to apo B contained in the emulsions associated to apo B and in LDL, compared to the apo B-free emulsions. The latter, as confirmed in the in vitro experiments, is capable of adsorbing more apo E, and this apolipoprotein has higher affinity for the receptor. Enhanced receptor activity induced by pre-treatment of the rats with 17 α -ethynylestradiol resulted in augmented plasma removal of both emulsions but nonetheless the cholesteryl ester plasma removal of the apo B-containing particles was still lower, compared to that of the apo B-free emulsion.

These data indicate that apo B-containing emulsion exhibits metabolic behaviour similar to that of LDL, and this emulsion can be an adequate tool to test LDL metabolism.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS*

1. ANGELIN, B., RAVIOLA, C.A., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W. - Regulation of hepatic lipoprotein receptors in dog. Rapid regulation of apolipoprotein B,E receptors but not of apolipoprotein E receptors, by intestinal lipoproteins and bile acids. J. Clin. Invest., New York, v. 71, p. 816-831, 1983.
2. AVIRAM, M., LUND-KATZ, S., PHILLIPS, M.C., CHAIT, A. - The influence of the triglyceride content of low density lipoprotein on the interaction of apolipoprotein B-100 with cells. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 263, p. 16842-8, 1988.
3. 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. 165-9, 1979.
4. 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.
5. BARTLETT, G.R. - Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 234, p. 466-8, 1959.
6. BEISIEGEL, U., WEBER, W., IHRKE, G., HERZ, J., STANLEY, K.K. - The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. Nature, London, v. 341, p. 162-4, 1989.
7. BERNAN M., HALL III, M., LEVY, R.I., EISENBERG, S., BILHE-MEIER, 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.
8. BHATTACHARYA, S., BALASUBRAMANIAM, S., SIMONS, L.A. - Role of the liver in low-density-lipoprotein catabolism in the rat. Biochem. J., London, v. 220, p. 333-6, 1984.
9. BHATTACHARYA, S., BALASUBRAMANIAM, S., SIMONS, L.A. - Regulation of low-density-lipoprotein metabolism in the rat. Biochem. J., London, v. 234, p. 493-6, 1986.

.....

* De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1990.

10. BILHEMEIER, D.W., WATANABE, Y., KITA, T. - Impaired receptor-mediated catabolism of low density lipoprotein in the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 79, p. 3305-9, 1982.
11. BREWER Jr., H.B., GREGG, R.E., HOEG, J.M., FOJO, S.S. - Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: an overview. Clin. Chem., Winston-Salem, v. 34(B), p. B4-8, 1988.
12. 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. 663-7, 1983.
13. BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. - Receptor-mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 76, p. 3330-7, 1979.
14. BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. - Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu. Rev. Biochem., Palo Alto, v. 52, p. 223-61, 1983.
15. BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. - Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. J. Clin. Investig., New York, v. 72, p. 743-7, 1983.
16. BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. - A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, Washington, v. 232, p. 34-47, 1986.
17. CARDIN, A.D., WITT, K.R., CHAO, J., MARGOLIUS, H.S., DONALDSON, V.H., JACKSON, R.L. - Degradation of apolipoprotein B-100 of human plasma low density lipoproteins by tissue and plasma kallikreins. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 259, p. 852-8, 1984.
18. CARELLA, M., COOPER, A.D. - High affinity binding of chylomicron remnants to rat liver plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 76, p. 338-42, 1979.
19. CASTER, W.O., PONCELET, J., SIMON, A.B., ARMSTRONG, W.D. - Tissue weights of the rat. I. Normal values determined by dissection and chemical methods. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, v. 91, p. 122-6, 1956.
20. CATAPANO, A.L. - The low density lipoprotein receptor: structure, function and pharmacological modulation. Pharmacol. Ther., Oxford, v. 43, p. 187-219, 1989.

21. CÉSAR, T.B. - Metabolismo de microemulsões semelhantes à fase lipídica da LDL no rato. São Paulo, 1990. [Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
22. CÉSAR, T.B., PEDROSO, S.R., HIRATA, M.H., QUINTÃO, E.C.R., MARANHÃO, R.C. - Metabolic behavior of protein-free microemulsion of phosphatidylcholine and cholesteryl oleate in the rat. Arg. Biol. Technol., Curitiba, v. 30, p. 13, 1987.
23. CHAO, Y.S., WINDLER, E.E., CHEN, G.C., HAVEL, R.J. - Hepatic catabolism of rat and human lipoproteins in rats treated with 17 α -etinil estradiol. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 254, p. 11360-6, 1979.
24. CHAPMAN, M.J. - Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. Meth. Enzymol., New York, v. 128A, p. 70-143, 1986.
25. CHAPPELL, D.A. - High receptor binding affinity of lipoproteins in atypical dysbetalipoproteinemia (Type III hiperlipoproteinemia). J. Clin. Invest., New York, v. 84, p. 1906-15, 1989.
26. CHEN, S.H., HABIB, G., YANG, C.Y., GU, Z.W., LEE, B.R., WENG, S.A., SILBERMAN, S.R., CAI, S.J., DESLYPERE, J.P., ROSSENEU, M., GOTTO Jr., A.M., LI, W.H., CHAN, L. - Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. Science, Washington, v. 238, p. 363-6, 1987.
27. CLADARAS, D., CLADARAS, M.H., NOLTE, R.T., ATKINSON, D., ZANNIS, V.I. - The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apo B-48 forms. EMBO J., Oxford, v. 5, p. 3495-507, 1986.
28. CORSINI, A., FANTAPÉ, S., GRANATA, A., BERNINI, F., CATAPANO, A.L., FUMAGALLI, R., ROMANO, L., ROMANO, C. - Binding-defective low-density lipoprotein in family with hypercholesterolaemia. Lancet, London, v. 8638, p. 623, 1989.
29. DAVIES, P.F. - Biology of disease. Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. Lab. Invest., Washington, v. 55, p. 5-24, 1986.
30. DEMANT, T., HOULSTON, R.S., CASLAKE, M.J., SERIES, J.J., SHEPHERD, J., PACKARD, C.J., HUMPHRIES, S.E. - Catabolic rate of low density lipoprotein is influenced by variation in the apolipoprotein B gene. J. Clin. Invest., New York, v. 82, p. 797-802, 1988.

31. DOLPHIN, P.J. - Lipoprotein metabolism and the role of apolipoproteins as metabolic programmers. Can. J. Biochem. Cell Biol., Ottawa, v. 63, p. 850-69, 1985.
32. EISENBERG, S. - High density lipoprotein metabolism. J. Lipid Res., New York, v. 24, p. 1017-58, 1984.
33. EISENBERG, S., FRIEDMAN, G., VOGEL, T. - Enhanced metabolism of normolipidemic human plasma very low density lipoprotein in cultured cells by exogenous apolipoprotein E-3. Arteriosclerosis, Dallas, 8, p. 480-7, 1988.
34. ELOVSON, J., CHATTERTON, J.E., BELL, G.T., SCHUMAKER, V.N., BEUBEN, M.A., PUPPIONE, D.L., REEVE Jr., J.R., YOUNG, N.L. - Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B. J. Lipid Res., New York, v. 29, p. 1461-73, 1988.
35. ELOVSON, J., HUANG, Y.O., BAKER, N., KANNAN, R. - Apolipoprotein B is structurally and metabolically heterogeneous in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 78, p. 157-61, 1981.
36. FAINARU, M., MAHLEY, R.W., HAMILTON, R.L., INNERARITY, T.L. - Structural and metabolic heterogeneity of beta-very low density lipoproteins from cholesterol-fed dogs and from humans with type III hyperlipoproteinemia. J. Lipid Res., New York, v. 23, p. 702-14, 1982.
37. FERES, M.C. - Cinética plasmática de emulsões ricas em triglicerídeos no jejum e após dieta-teste, em indivíduos normais e dislipidêmicos. São Paulo, 1990. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
38. FLORÉN, C.H. - Binding of apolipoprotein E-rich remnant lipoproteins to human liver membranes. Scand. J. Gastroenterol., Oslo, v. 19, p. 473-9, 1984.
39. FOGELMAN, A.M., SHECHTER, I., SEAGER, J., HOKOM, M., CHILD, J.S., EDWARDS, P.A. - Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 77, p. 2214-8, 1980.
40. FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, H.S. - A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 226, p. 497-509, 1957.
41. FOSTER, D.M., CHAIT, A., ALBERS, J.J., FAILOR, R.A., HARRIS, C., BRUNZELL, J.D. - Evidence for kinetic

heterogeneity among human low density lipoproteins. Metabolism, New York, v. 35, p. 685-96, 1986.

42. FUNAHASHI, T., YOKOYAMA, S., YAMAMOTO, A. - Association of apolipoprotein E with the low density lipoprotein receptor: demonstration of its co-operativity on lipid microemulsion particles. J. Biochem., Tokyo, v. 105, p. 582-7, 1989.
43. GIBBONS, G.F. - Assembly and secretion of very-low-density lipoprotein. Biochem. J., London, v. 268, p. 1-13, 1990.
44. GINSBURG, G.S., SMALL, D.M., ATKINSON, D. - Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Proteins-free models of low density lipoprotein. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 257, p. 8216-27, 1982.
45. GINSBURG, G.S., WALSH, M.T., SMALL, D.M., ATKINSON, D. - Ressembled plasma low density lipoproteins. Phospholip-cholesterol ester-apoprotein B complexes. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 259, p. 6667-73, 1984.
46. GLOMSET, J.A., NORUM, K. R. - The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. Adv. Lipid Res., New York, v. 11, p. 1-65, 1973.
47. GOLDSTEIN, J.L., ANDERSON, R.D.W., BROWN, M.S. - Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. Nature, London, v. 279, p. 679-85, 1979.
48. GOLDSTEIN, J.L., BROWN M.S. - Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 249, p. 5133-62, 1974.
49. GOLDSTEIN, J.L., BROWN M.S. - The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. Annu. Rev. Biochem., Palo Alto, v. 46, p. 897-930, 1977.
50. GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. - Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. Metabolism, New York, v. 26, p. 1257-75, 1977.
51. GOLDSTEIN, J.L., HO, Y.K., BROWN, M.S. - Cholesterol ester accumulation in macrophages resulting from receptor-mediated uptake and degradation of hypercholesterolemic canine beta-very low density lipoproteins. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 255, p. 1839-48, 1980.
52. GOLDSTEIN, J.L., KITA, T., BROWN, M.S. - Defective lipoproteins receptors and atherosclerosis. N. Engl. J. Med., Boston, v. 309, p. 288-96, 1983.

53. GONEN, B., COLE, T., HAMM, K.S. - The interaction of carbamylated low-density lipoprotein with cultured cells. Studies with human fibroblasts, rat peritoneal macrophages and human monocyte-derived macrophages. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 754, p. 201-7, 1983.
54. GOTTO, A.M., POWNALL, H.J., HAVEL, R.J. - Introduction to the plasma lipoproteins. Methods Enzymol., New York, v. 128A, p. 3-41, 1986.
55. GREEN, S.R., PITTMAN, R.C. - Selective uptake of cholesteryl esters from low density lipoproteins in vitro and in vivo. J. Lipid Res., New York, v. 32, p. 667-78, 1991.
56. GUSTAFSON, A., KANE, J.P., HAVEL, R.J. - Determinants of kallikrein proteolysis of apolipoprotein B-100 in human blood plasma. Eur. J. Clin. Invest., Berlin, v. 18, p. 75-80, 1988.
57. HAVEL, R.J. - The formation of LDL: mechanisms and regulation. J. Lipid Res., New York, v. 25, p. 1570-6, 1984.
58. HAYASHI, K., KOIDE, K., HIRATA, Y., OHTANI, H., YAMADA, K., KAJIYAMA, G. - Metabolic changes in lipids of rat plasma and hepatocytes induced by 17 α -ethynylestradiol treatment. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 879, p. 140-8, 1986.
59. HERZ, J., HAMANN, U., ROGNE, S., MYKLEBOST, O., GAUSEPOHL, H., STANLEY, K.K. - Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. EMBO J., Oxford, v. 7, p. 4119-27, 1988.
60. HIRATA, M.H., OLIVEIRA, H.C.F., QUINTÃO, E.D.R., REDGRAVE, T.G., MARANHÃO, R.C. - The effects of triton WR-1339, protamine sulfate and heparin on the plasma removal of emulsion models of chylomicrons and remnants in rats. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 917, p. 344-6, 1987.
61. HOEG, J.M., SVIRIDOV, D.D., TENNYSON, G.E., DEMOSKY Jr., S.J., MENG, M.S., BOJANOVSKI, D., SAFONOVA, I.G., REPIN, V.S., KUBERGER, M.B., SMIRNOV, V.N., HIGUCHI, K., GREGG, R.E., BREWER Jr., H.B. - Both apolipoproteins B-48 and B-100 are synthesized and secreted by the human intestine. J. Lipid Res., New York, v. 31, p. 1761-9, 1990.
62. HOPKINS, G.J., BARTER, P.J. - Dissociation of the in vitro transfers of esterified cholesterol and triglyceride

- between human lipoproteins. Metabolism, New York, v. 31, p. 78-81, 1982.
63. HOSPATTANKAR, A.V., LAW, S.W., LACKNER, K., BREWER Jr., H.B. - Identification of low density lipoprotein receptor binding domains of human apolipoprotein B-100: a proposed consensus LDL receptor binding sequence of apoB-100. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, v. 139, p. 1078-85, 1986.
 64. HUI, D.Y., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W. - Lipoprotein binding to canine hepatic membranes. Metabolic distinct apo-E and apo-B,E receptors. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 256, p. 5646-55, 1981.
 65. HUI, D.Y., INNERAIRTY, T.L., MAHLEY, R.W. - Defective hepatic lipoprotein receptor binding of beta-very low density lipoproteins from type III hypertriglyceridemic patients. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 259, p. 860-9, 1984.
 66. HUI, D.Y., INNERARITY, T.L., MILNE, R.W., MARCEL, Y.L., MAHLEY, R.W. - Binding of chylomicron remnants and beta-very low density lipoproteins to hepatic and extrahepatic lipoprotein receptors. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 259, p. 15060-8, 1984.
 67. HUSSAIN, M.M., ZANNI, E.E., KELLY, M., ZANNIS, V.I. - Synthesis, modification, and flotation properties of rat hepatocyte apolipoproteins. Biochim. Biophys. Acta., Amsterdam, v. 1001, p. 90-101, 1989.
 68. INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W., WEISGRABER, K.H., BERSOT, T.P., KRAUSS, R.M., VEGA, G.L., GRUNDY, S.M., FRIEDL, W., DAVIGNON, J., MCCARTHY, B.J. - Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. J. Lipid Res., New York, v. 31, p. 1337-49, 1990.
 69. INNERARITY, T.L., PITAS, R.E., MAHLEY, R.W. - Binding of arginine-rich (E) apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 254, p. 4186-90, 1979.
 70. INNERARITY, T.L., PITAS, R.E., MAHLEY, R.W. - Receptor binding of cholesterol-induced high-density lipoproteins containing predominantly apoprotein E to cultured fibroblasts with mutations at the low-density lipoprotein receptor locus. Biochemistry, Washington, v. 19, p. 4359-65, 1980.
 71. INNERARITY, T.L., WEISGRABER, K.H., ARNOLD, K.S., MAHLEY, R.W., KRAUSS, R.M., VEGA, G.L., GRUNDY, S.M. - Familial

- defective apolipoprotein B-100: Low density lipoproteins with abnormal receptor binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 84, p. 6919-23, 1987.
72. 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. 1151-8, 1984.
 73. KANE, J.P. - Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. Annu. Rev. Physiol., Palo Alto, v. 45, p. 637-50, 1983.
 74. KESANIEMI, Y.A., WITZTUM, J.L., STEINBRECHER, U.P. - Receptor-mediated catabolism of low density lipoprotein in man. J. Clin. Invest., New York, v. 71, p. 950-9, 1983.
 75. KINOSHITA, M., KRUL, E.S., SCHONFELD, G. - Modification of the core lipids of low density lipoproteins produces selective alterations in the expression of apoB-100 epitopes. J. Lipid Res., New York, v. 31, p. 701-8, 1990.
 76. KNOTT, T.J., PEASE, R.J., POWELL, L.M., WALLIS, S.C., RALL Jr, S.C., INNERARITY, T.L., BLACKHART, B., TAYLOR, W.H., MARCEL, Y., MILNE, R., JOHNSON, D., FULLER, M., LUSIS, A.J., MCCARTHY, B.J., MAHLEY, R.W., LEVY-WILSON, B., SCOTT, J. - Complete proteins sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. Nature, London, v. 323, p. 734-89, 1986.
 77. KOGA, S., HORWITZ, D.L., SCANU, A.M. - Isolation and properties of lipoproteins from normal rat serum. J. Lipid Res., New York, v. 10, p. 577-88, 1969.
 78. 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.
 79. KOVANEN, P.T., BILHEMEIER, D.W., GOLDSTEIN, J.L., JARAMILLO, J.J., BROWN, M.S. - Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors in vivo in the dog. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 78, p. 1194-8, 1981.
 80. KOVANEN, P.T., BROWN, M.S., BASU, S.K., BILHEMEIER, D.W., GOLDSTEIN, J.L. - Saturation and suppression of hepatic lipoprotein receptors: a mechanism for the hypercholesterolemia of cholesterol-fed rabbits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 78, p. 1396-400, 1981.

81. KOVANEN, P.T., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. - Increased binding of low density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17α -ethinyl estradiol. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 254, p. 11367-73, 1979.
82. KOVANEN, P.T., SCHNEIDER, W.J., HILLMAN, G.H., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. - Separate mechanisms for the uptake of high and low density lipoproteins by mouse adrenal gland *in vivo*. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 254, p. 5498-505, 1979.
83. KOWAL, R.C., HERZ, J., GOLDSTEIN, J.L., ESSER, V., BROWN, M.S. - Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 86, p. 5810-4, 1989.
84. KRUL, E.S., TIKKANEN, M.J., COLE, T.G., DAVIE, J.M., SCHONFELD, G. - Roles of apolipoproteins B and E in the cellular binding of very low density lipoproteins. J. Clin. Invest., New York, v. 75, p. 361-9, 1985.
85. KUIPERS, F., NAGELKERKE, J.F., BAKKEREN, H.F., HAVINGA, R., VAN BERKEL, T.J.C., VONK, R.J. - Processing of cholesteryl ester from low-density lipoproteins in the rat. Biochem. J., London, v. 257, p. 699-704, 1989.
86. KWITEROVICH Jr., P.O. - HyperapoB: a pleiotropic phenotype characterized by dense low-density lipoproteins and associated with coronary artery disease. Clin. Chem., Winston-Salem, v. 34(B), p. B71-7, 1988.
87. KWITEROVICH Jr., P.O., MOTEVALL, M., MILLER, M., BACHORIK, P.S., KAFONET, S.D., CHATTERJEE, S., BEATY, T., VIRGIL, D. - Further insights into the pathophysiology of hyperapobetalipoproteinemia: role of basic proteins I, II, III. - Clin. Chem., Winston-Salem, v. 37, p. 317-26, 1991.
88. LAW, A., SCOTT, J. - A cross-species comparison of the apolipoprotein B domain that binds to the LDL receptor. J. Lipid Res., New York, v. 31, p. 1109-20, 1990.
89. LAW, S.W., GRANT, S.M., HIGUCHI, K., HOSPATTANKAR, A., LACKNER, K., LEE, N., BREWER Jr., H.B. - Human liver apolipoprotein B-100 cDNA, p. Complete nucleic acid and derived amino acid sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 83, p. 8142-6, 1986.
90. LEFFLER, H.H., MacDOUGALD, H. - Estimation of cholesterol in serum. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, v. 39, p. 311-5, 1963.

91. LEVY, E., ROCHETTE, C., LONDONO, I., ROY, C., MILNE, R., MARCEL, Y.L., BENDAYAN, M. - Apolipoprotein B-100: immunolocalization and synthesis in human intestinal mucosa. J. Lipid Res., New York, v. 31, 1937-46, 1990.
92. LI, Q.T., TILLEY, L., SAWYER, W.H., LOONEY, F., CURTAIN, C.C. - Structure and dynamics of microemulsions which mimic the lipid phase of low-density lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 1042, p. 42-50, 1990.
93. LUND, H., TAKAHASHI, K., HAMILTON, R.L., HAVEL, R.J. - Lipoprotein binding and endosomal itinerary of the low density lipoproteins receptor-related protein in rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 86, p. 9318-22, 1989.
94. LUND-KATZ, S., INNERARITY, T.L., ARNOLD, K.S., CURTISS, L.K., PHILLIPS, M.C. - ^{13}C NMR evidence that substitution of glutamine for arginine 3500 in familial defective apolipoprotein B-100 disrupts the conformation of the receptor-binding domains. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 266, p. 2701-4, 1991.
95. LUNDBERG, B., ALAJAASKI, M. - Lipoprotein models: ultrasonicated emulsions of phosphatidyl-choline, cholesterol and triolein. Acta Chem. Scand., Copenhagen, v. B33, p. 86-92, 1979.
96. LUNDBERG, B., SAARINEN, E.R. - Preparation of stable, optically clear emulsions of triolein and cholesterol oleate by ultrasonication with egg lecithin. Chem. Phys. Lipids, Shannon, v. 14, p. 260-2, 1975.
97. LUNDBERG, B., SUOMINEN, L. - Preparation of biologically active analogs of serum low density lipoprotein. J. Lipid Res., New York, v. 25, p. 550-8, 1984.
98. MAHLEY, R.W. - Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science, Washington, v. 240, p. 622-30, 1988.
99. MAHLEY, R.W., INNERARITY, T.L. - Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 737, p. 197-222, 1983.
100. MAHELY, R.W., INNERARITY, T.L., PITAS, R.E., WEISGRABER, K.H., BROWN, J.H., GROSS, E. - Inhibition of lipoprotein binding to cell surface receptors of fibroblasts following selective modification of arginyl residues in arginine-rich and B apoproteins. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 252, p. 7279-87, 1977.

101. 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. 1277-94, 1984.
102. MALMENDIER, C.L., DELCROIX, C., LONTIE, J.F. - Kinetics of a heterogeneous population of particles in low density lipoprotein apolipoprotein B. Atherosclerosis, Shannon, v. 80, p. 91-100, 1989.
103. MARANHÃO, R.C., ROLAND, I.A., HIRATA, M.H. - Effects of triton WR 1339 and heparin on the transfer of surface lipids from triglyceride-rich emulsions to high density lipoproteins in rats. Lipids, Champaign, v. 25, p. 701-5, 1990.
104. MARANHÃO, R.C., TERCYAK, A.M., REDGRAVE, T.G. - Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 875, p. 247-55, 1986.
105. MARCEL, Y.L., INNERARITY, T.L., SPILMAN, C., MAHLEY, R.W., PROTTER, A.A., MILNE, R.W. - Mapping of human apolipoprotein B antigenic determinants. Arteriosclerosis, Dallas, v. 7, p. 166-75, 1987.
106. MARCELL, Y.L., HOGUE, M., WEECH, P.K., DAVIGNON, J., MILNE, R.W. - Expression of apolipoprotein B epitopes in lipoproteins. Arteriosclerosis, Dallas, v. 8, p. 832-44, 1988.
107. MARKWELL, M.A., HAAS, S.M., BIEBER, L.L., TOLBERT N.E. - A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem., Baltimore, v. 87, p. 206-210, 1978.
108. MATTHEWS, C.M.E. - The theory of tracer experiments with ¹³¹I-labelled plasma proteins. Phys. Med. Biol., London, v. 2, p. 36-53, 1957.
109. MILLER, K.W., SMALL, D.M. - Triolein-cholesteryl oleate-cholesterol-lecithin emulsions, p. structural models of triglyceride-rich lipoproteins. Biochemistry, Washington, v. 22, p. 443-51, 1983.
110. MILLER, K.W., SMALL, D.M. - Surface-to-core and interparticle equilibrium distributions of triglyceride-rich lipoproteins lipids. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 258, p. 13772-84, 1983.
111. MILNE, R., THEOLIS Jr., R., MAURICE, R., PEASE, R.J., WEECH, P.K., RASSAR, E., FRUCHART, J.-C., SCOTT, J., MARCEL, Y.L. - The use of monoclonal antibodies to localize the low density lipoprotein receptor-binding

- domain of apolipoprotein B. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 264, p. 19754-60, 1989.
112. MILNE, R.W., WEECH, P.K., MARCEL, Y.L. - Heterogeneity of apolipoprotein B containing lipoproteins. Adv. Exp. Med. Biol., New York, v. 210, p. 1-5, 1987.
 113. MIMS, M.P., GUYTON, J.R., MORRISETT, J.D. - Microemulsions of cholesteryl oleate and dimyristoylphosphatidylcholine: a model for cholesteryl ester rich very low density lipoproteins. Biochemistry, Washington, v. 25, p. 474-83, 1986.
 114. MIMS, M.P., SOMA, M.R., MORRISETT, J.D. - Effect of particle size and temperature on the conformation and physiological behavior of apolipoprotein E bound to model lipoprotein particles. Biochemistry, Washington, v. 29, p. 6639-47, 1990.
 115. MORTIMER, B.C., SIMMONDS, W.J., JOLL, C.A., STICK, R.V., REDGRAVE, T.G. - The effect of added monoacylglycerols on the removal from plasma of chylomicron-like emulsions injected intravenously in rats. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 1002, p. 359-64, 1989.
 116. MORTON, R.E., ZILVERSMIT, D.B. - Inter-relationship of lipids transferred by the lipid-transfer protein isolated from human lipoprotein-deficient plasma. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 258, p. 11751-7, 1983.
 117. MURTHY, V.N., MARZETTA, C.A., RUDEL, L.L., ZECH, L.A., FOSTER, D.M. - Hepatic apo B-100 lipoproteins and plasma LDL heterogeneity in African green monkeys. Am. J. Physiol., Bethesda, v. 258, p. E1041-57, 1990.
 118. NAGELKERKE, J.F., BAKKEREN, H.F., KUIPERS, F., VONK, R.J., VAN BERKEL, T.J.C. - Hepatic processing of the cholesteryl ester from low density lipoprotein in the rat. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 261, p. 8908-13, 1986.
 119. NAGELKERKE, J.F., BARTO, K.P., VAN BERKEL, T.J.C. - In vivo and in vitro uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by rat liver endothelial, Kupffer, and parenchymal cells. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 258, p. 12221-7, 1983.
 120. NEVILLE, D.M. - Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 246, p. 6328-34, 1971.

121. NILSSON-EHLE, P. - Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. Annu. Rev. Biochem., Palo Alto, v. 49, p. 667-93, 1980.
122. NORUM, K.R., BERG, T. HERGERUD, P., DREVON, C.A. - Transport of cholesterol. Physiol. Rev., Bethesda, v. 63, p. 1343-419, 1983.
123. OLIVEIRA, H.C.F., HIRATA, M.H., REDGRAVE, T.G., MARANHÃO, R.C. - Competition between chylomicrons and their remnants removal: a study artificial emulsion models of chylomicrons. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 958, p. 211-17, 1988.
124. OLOFSSON, A.O., BJURSELL, G., BOSTROM, K., CARLSSON, P., ELOVSON, J., PROTTER, A.A., REUBEN, M.A., BONDJERS, G. - Apolipoprotein B: structure, biosynthesis and role in the lipoprotein assembly process. Atherosclerosis, Shannon, v. 68, p. 1-17, 1987.
125. OSBORNE Jr., J.C. - Delipidation of plasma lipoproteins. Methods Enzymol., New York, v. 128A, p. 213-22, 1986.
126. OTTA, M.I. - Microemulsões contendo diferentes concentrações de triacilgliceróis: estudo da remoção plasmática em ratos. São Paulo, 1990. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
127. 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. 2178-92, 1984.
128. PITAS, R.E., INNERARITY, T.L., ARNOLD, K.S., MAHLEY, R.W. - Rate and equilibrium constants for binding of apo-E HDL₂ (a cholesterol-induced lipoprotein) and low density lipoproteins to human fibroblasts: evidence for multiple receptor binding of apo-E HDL₂. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 76, p. 2311-15, 1979.
129. PITAS, R.E., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W. - Cell surface receptor binding of phospholipid-protein complexes containing different ratios of receptor-active and -inactive E apoprotein. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 255, p. 5454-60, 1980.
130. PITTMAN, R.C., STEINBERG, D. - Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density and low density lipoproteins. J. Lipid Res., New York, v. 25, p. 1577-85, 1984.

131. REDGRAVE, T.G. - Formation and metabolism of chylomicrons. Int. Rev. Physiol., Baltimore, v. 28, p. 103-30, 1983.
132. REDGRAVE, T.G. KODALI, D.R., SMALL, D.M. - The effect of triacyl-sn-glycerol structure on the metabolism of chylomicrons and triacylglycerol-rich emulsions in the rat. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 263, p. 5118-23, 1988.
133. 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.
134. REDGRAVE, T.G., VASSILOU, G.G., CALLOW, M.J. - Cholesterol is necessary for triacylglycerol-phospholipid emulsions to mimic the metabolism of lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 921, p. 154-7, 1987.
135. REISINGER, R.E., ATKINSON, D. - Phospholipid/cholesteryl ester microemulsions containing unesterified cholesterol: model systems for low density lipoproteins. J. Lipid Res., New York, v. 31, p. 849-58, 1990.
136. RIFAI, N. - Lipoproteins and apolipoproteins. Arch. Pathol. Lab. Med., Chicago, v. 110, p. 694-701, 1986.
137. ROBINS, S.J., FASULO, J.M., PATTON, G.M. - Effect of different molecular species of phosphatidylcholine on the clearance of emulsion particle lipids. J. Lipid Res., New York, v. 29, p. 1195-203, 1988.
138. ROHEIM, P.S., RACHMILEWITZ, D., STEIN, O., STEIN, Y. - Metabolism of iodinated high density lipoproteins in the rat. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 248, p. 315-29, 1971.
139. ROLAND, I.A., HIRATA, M.H., CHAMONE, D.A.F., MARANHÃO, R.C. - Effects of experimental diabetes, hypothyroidism and ethanol consumption on the transfer of surface lipids between lipoproteins. Arg. Biol. Technol., Curitiba, v. 32, p. 89, 1989.
140. RUDEL, L.L., PARKS, J.S., JOHNSON, F.L., BABIAK, J. Low density lipoproteins in atherosclerosis. J. Lipid Res., New York, v. 27, p. 465-74, 1986.
141. SAXENA U., KLEIN, M.G., GOLDBERG, I.J. - Transport of lipoprotein lipase across endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 88, p. 2254-8, 1991.

142. SCOTT, J. - Unravelling atherosclerosis. Nature, London, v. 338, p. 118-9, 1989.
143. SHERRIL, B.C., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W. - Rapid hepatic clearance of the canine lipoproteins containing only the E apolipoprotein by a high affinity receptor. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 255, p. 1804-7, 1980.
144. SIEDEL, J., SCHULUMBERGER, H., KLOSE, S., ZIEGENHORN, J., WAHLEFELD, A.W. - Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Berlin, v. 19, p. 838-9, 1981.
145. SILVA, R.C. - Atividade das proteínas de transferência de lipídeos, lipase lipoproteica e lecitina colesterol acil-transferase sobre emulsões ricas em triglicerídeos "in vitro". São Paulo, 1990. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
146. SLATER, H.R., PACKARK, C.J., BICKER, S., SHEPHERD, J. - Effects of cholestyramine on receptor-mediated plasma clearance and tissue uptake of human low density lipoproteins in the rabbit. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 255, p. 10210-3, 1980.
147. SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. Statistical methods. 7. ed., Ames: The Iowa State University Press, 1989. 503 p.
148. SOLONI, F.G. - Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. Clin. Chem., Winston-Salem, v. 17, p. 529-34, 1971.
149. SORIA, L.F., LUDWIG, E.H., CLARKE, H.R.G., VEGA, G.L., GRUNDY, S.M. - Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 86, p. 587-91, 1989.
150. SPARKS, C.E., HNATIUK, O., MARSH, J.B. - Hepatic and intestinal contribution of two forms of apolipoprotein B to plasma lipoprotein fractions in the rat. Can. J. Biochem., Ottawa, v. 59, p. 693-9, 1981.
151. SPARKS, C.E., MARSH, J.B. - Metabolic heterogeneity of apolipoprotein B in the rat. J. Lipid Res., New York, v. 22, p. 519-27, 1981.
152. SPARKS, J.D., SPARKS C.E. - Apolipoprotein B and lipoprotein metabolism. Adv. Lipid Res., New York, v. 21, p. 1-46, 1985.
153. STEIN, Y., HALPERIN, G., STEIN, O. - Biological stability of [3 H]cholesteryl oleyl ether in cultured fibroblasts

- and intact rat. FEBS Lett., Amsterdam, v. 111, p. 104-6, 1980.
154. STEIN, Y., HALPERIN, G., STEIN, O. - The fate of cholesteryl linoleyl ether and cholesteryl linoleate in the intact rat after injection of biologically labeled human low density lipoprotein. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 663, p. 569-74, 1981.
 155. TAJIMA, S., YOKOYAMA, S., YAMAMOTO, A. - Effect of lipid particle size on association of apolipoproteins with lipid. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 258, p. 10073-82, 1983.
 156. TALL, A.R. - Plasma lipid transfer proteins. J. Lipid Res., New York, v. 27, p. 361-7, 1986.
 157. TURKLEY, S.D., ANDERSEN, J.M., DIETSCHY, J.M. - Rates of sterol synthesis and uptake in the major organs of the rat in vivo. J. Lipid Res., New York, v. 22, p. 551-69, 1981.
 158. VAN BERKEL, J.C., KRUIJT, J.K., SCHEEK, L.M., GROOT, P.H.E. - Effect of apolipoproteins E and C-III on the interaction of chylomicrons with parenchymal and non-parenchymal cells from rat liver. Biochem. J., London, v. 216, p. 71-80, 1983.
 159. VAN LENTEN, B.J., FOGELMAN, A.M., HOKON, M.M., BENSON, L., HABERLAND, M.E., EDWARDS, P.A. - Regulation of the uptake and degradation of beta-very low density lipoprotein in human monocyte macrophages. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 258, p. 5151-7, 1983.
 160. VEGA, G.L., GRUNDY, S.M. - In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. J. Clin. Invest., New York, v. 78, p. 1410-4, 1986.
 161. VIA, D.P., CRAIG, I., F., JACOBS, G.W., VAN WINKLE, W.B., CHARLTON, S.C., GOTTO Jr., A.M., SMITH, L.C. - Cholesteryl ester-rich microemulsions: stable protein-free analogs of low density lipoproteins. J. Lipid Res., New York, v. 23, p. 570-6, 1982.
 162. WAHLEFELD, A.W. - Triglycerides: colorimetric method. In: BERGMAYER, H.U., ed. Methods of enzymatic analysis, 3. ed., Weinheim: Verlag Chemie, 1985. v. 8, p. 12-18.
 163. WALSH, M.T., ATKINSON, D. - Solubilization of low-density lipoprotein with sodium deoxycholate and recombination of apoprotein B with dimyristoylphosphatidylcholine. Biochemistry, Washington, v. 22, p. 3170-8, 1983.

164. WALSH, M.T., ATKINSON, D. - Reassembly of low density lipoprotein. Methods Enzymol., New York, v. 128A, p. 582-608, 1986.
165. WEISGRABER, K.H., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W. - Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 253, p. 9053-62, 1978.
166. WEISGRABER, K.H., INNERARITY, T.L., RALL Jr., S.C., MAHLEY, R.W. - Receptor interactions controlling lipoprotein metabolism. Can. J. Biochem. Cell Biol., Ottawa, v. 63, p. 898-905, 1985.
167. WILSON, C., WARDELL, M.R., WEISGRABER, K.H., MAHLEY, R.W., AGARD, D.A. - Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. Science, Washington, v. 252, p. 1817-23, 1991.
168. WINDLER, E., CHAO, Y-S., HAVEL, R.J. - Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 255, p. 8303-7, 1980.
169. WINDLER, E.E., KOVANEN, P.T., CHAO, Y.C., BROWN, M.S., HAVEL, R.J., GOLDSTEIN, J.L. - The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 255, 10464-71, 1980.
170. WINDMUELLER, H.G., SPAETH, A.E. - Regulated biosynthesis and divergent metabolism of three forms of hepatic apolipoprotein B in the rat. J. Lipid Res., New York, v. 26, p. 70-81, 1985.
171. WU, A.L., WINDMUELLER, H.G. - Identification of circulating apolipoproteins synthesized by rat small intestine in vivo. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 253, p. 2525-8, 1978.
172. WU, A.L., WINDMUELLER, H.G. - Variant forms of plasma apolipoprotein B. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 256, p. 3615-8, 1981.
173. YAMAMOTO, T., DAVIS, C.G., BRWON, M.S., SCHNEIDER, W.J., CASEY, M.L., GOLDSTEIN, J.L., RUSSELL, D.W. - The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple alu sequences in its mRNA. Cell, Cambridge, v. 39, p. 27-38, 1984.
174. YAMASHITA, S., SPRECHER, D.L., SAKAI, N., MATSUZAWA, Y., TARUI, S., HUI, D.Y. - Accumulation of apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in

hyperalphalipoproteinemic human subjects. J. Clin. Invest., New York, v. 86, p. 688-95, 1990.

175. YANG, C.Y., CHEN, S.H., GIANTURCO, S.H., BRADLEY, W.A., SPARROW, J.T., TANIMURA, M., LI, W.H., SPARROW, D.A., DeLOOF, H., ROSSENEU, M., LEE, F.S., GU, Z.W., GOTTO Jr., A.M., CHAN, L. - Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. Nature, London, v. 323, p. 738-42, 1986.
176. YANG, C.Y., GU, Z.W., WENG, S., KIM, T.W., CHEN, S.H., POWNALL, H.J., SHARP, P.M., LIU, S.W., LI, W.H., GOTTO Jr., A.M., CLAU, L. - Structure of apolipoprotein B-100 of human low density lipoproteins. Arteriosclerosis, Dallas, v. 9, p. 96-108, 1989.
177. YANG, C.Y., KIM, T.W., WENG, S.A., LEE, B., YANG, M., GOTTO Jr., A.M. - Isolation and characterization of sulphidryl and disulphide peptides of human apolipoprotein B-100. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 87, p. 5523-7, 1990.
178. YLA-HERTTUALA, S., JAAKKOLA, O., EHNHOLM, C., TIKKANEN, M.J., SOLAKIVI, T., SARKIOJA, T., NIKKARI, T. - Characterization of two lipoproteins containing apolipoproteins B and E from lesion-free human aortic intima. J. Lipid Res., New York, v. 29, p. 563-72, 1988.
179. YOUNG, S.G. - Recent progress in understanding apolipoprotein B. Circulation, New York, v. 82, p. 1574-94, 1990.
180. ZANNIS, V.I. - Molecular biology of human apolipoproteins B and E and associated diseases of lipoprotein metabolism. Adv. Lipid Res., New York, v. 23, p. 1-64, 1989.
181. ZANNIS, V.I., BRESLOW, J.L. - Genetic mutations affecting human lipoprotein metabolism. Adv. Hum. Genet., New York, v. 14, p. 125-215, 1985.
182. ZANNIS, V.I., HUSSAIN, M.M., CLARADAS, M.H., KOUVATSI, A., KARDASSIS, D., CLARADAS, C. - Molecular biology of human apolipoprotein B and related diseases. Adv. Exp. Med. Biol., New York, v. 243, p. 107-21, 1988.