UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

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

EFEITOS DO TRITON WR 1339, SULFATO DE PROTAMINA E
HEPARINA SOBRE A LIPÓLISE E A REMOÇÃO PLASMÁTICA
DE QUILOMÍCRONS ARTIFICIAIS EM RATOS

MARIO HIROYUKI HIRATA

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Assist. Dr. RAUL C. MARANHÃO

São Paulo
1985

11097

A DEUS ...

À MEMÓRIA DE MEUS
INESQUECÍVEIS PAIS
TANEO E ASHAO HIRATA

À ROSÁRIO E THIAGO

cujo amor e compreensão

tornou possível a realização

deste trabalho

A todos os meus irmãos
que juntos cunham as
medalhas das minhas
vitórias

Ao PROF. DR. EDER C. R. QUINTÃO,
Chefe do Laboratório de Lípidos da FMUSP,
que nos permitiu desenvolver os conhecimentos
oferecendo toda a sua experiência científica
e a quem eu admiro muito.

Ao PROF. DR. RAUL C. MARANHÃO,
cuja orientação valiosa tornou
possível a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu Diretor José Carlos Barbério, que nos permitiu obter maiores conhecimentos científicos.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu Chefe Prof. Dr. Franco Maria Lajolo, que nos permitiu a obtenção de recursos científicos para o meu aperfeiçoamento.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em nome do seu Chefe Prof. Dr. Durval Mazzei Nogueira pela acolhida permitindo a minha ascensão nos conhecimentos científicos.

À minha Escola de Formação Universitária, cujo início da luta profissional foi permitida.

Ao Prof. Dr. Aytan M. Sipahi que com o espírito científico colaborou nas minhas árduas tarefas laboratoriais.

À bióloga Helena C. F. de Oliveira cuja colaboração na parte experimental foi extremamente importante e também pelo seu alto senso de companheirismo e dedicação.

À bióloga Lúcia N. Castilho cuja colaboração foi muito valiosa.

À farmacêutica-bioquímica Karin S. Vasconcelos cujas críticas e sugestões foram de extrema valia.

À Angela Cristina C. Rocha pelos serviços prestados e pela amizade.

A todos os meus companheiros do Laboratório de Lípides da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo cuja ajuda não mediram esforços: Celina Zerbinatti, Ivete A. Rolan, Ruth Bianchini, Anna C. Goldberg, Beatris de Fátima Coelho, Adérson O. M. C. Damião, Sonia Q. Doi, Simão Augusto Lottenberg, Senária M. E. Dias, Nair dos Santos, Cristina Filomena Justo e Thelma Cristina Schmidt.

Aos funcionários do Laboratório Clínico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial do setor de Bioquímica Clínica: Vicente Feitosa, José M. Koga, Célio Shigemura, Maurício dos Santos, Georgina Pedrosa, Roberto Ferolla, Lilian Shine, Lucy Rocha, Marieta F. Zacarias, Margarida Tavityan.

Ao Chefe da disciplina Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Bruno Strufaldi pela compreensão e amizade.

Aos colegas da disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo incentivo, amizade e colaboração: Dulcinéia S. Parra Abdalla, Durval M. Nogueira, Bruno Strufaldi, Gunter Hoxter, Leda T. Coelho e Carlos A. Sannazzaro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na elaboração deste trabalho.

Aos meus verdadeiros amigos.

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO.....	01
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
RESUMO.....	45
SUMMARY.....	46
APÊNDICE.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os lípidos absorvidos no intestino, provenientes da dieta, são transportados na linfa e na circulação sanguínea sob a forma de quilomícrons, lipoproteínas ricas em triglicérides sintetizadas no enterócito. Os quilomícrons são macroagregados moleculares constituídos, além dos triglicérides, de colesterol, colesteril-éster, fosfolípidos e apolipoproteínas (Fig. 1)^{51,76}.

Essas partículas possuem todas as classes de apolipoproteínas, com exceção da apolipoproteína B₁₀₀ (Apo B₁₀₀), que é sintetizada no fígado⁵¹. Como nas demais lipoproteínas, as apolipoproteínas desempenham uma série de funções na modulação do metabolismo das partículas, atuando como ativadores ou bloqueadores enzimáticos e mediadores da captação das partículas pela célula⁵². Ao entrarem na circulação plasmática, vindos da linfa, os quilomícrons sofrem uma série de transformações, tanto na sua superfície - constituída de fosfolípidos, colesterol e apolipoproteínas - quando no seu interior, onde se localizam os triglicérides e o colesteril-éster (Fig. 1). A nível de superfície, ocorre troca dos seus componentes com as outras lipoproteínas - principalmente as lipoproteínas de alta densidade (HDL)^{28,56}. Neste processo, os quilomícrons perdem fosfolípidos, levando à diminuição da relação molar fosfolípidos/colesterol. Por outro lado, há ganho

Fig. 1 . Metabolismo dos quilomícrons(modificado segundo Eisenberg, S. and Levy, R.I.)¹³.

de massa protéica pelas partículas, que passam a incorporar mais apolipoproteínas C, Apo AIV e Apo E, enquanto perdem Apo AI^{28,30,40}. Ao mesmo tempo, na superfície endotelial dos capilares de tecidos periféricos, como no músculo e tecido adiposo, os triglicérides transportados no quilomícron são hidrolisados pela lipase lipoproteica (E.C. 3.1.1.34), sendo que parte dos ácidos graxos livres resultantes são retidos pelas células, enquanto a outra parte é transportada na corrente sanguínea ligada à albumina^{7,35,72}.

A lipase lipoproteica é uma enzima ligada à membrana celular, cuja ação é estimulada pela Apo CII^{33,34}, constituinte normalmente presente nos quilomícrons. A ativação da enzima se dá através da interação entre o seu sítio ativo e o substrato⁶². Quando a Apo CII é deficiente, a metabolização dos quilomícrons fica prejudicada pela diminuição da lipólise, causando hipertrigliceridemia⁹. Em contrapartida a Apo CIII inibe a enzima, por mecanismo ainda desconhecido^{2,10,17,25,50}.

A lipase lipoproteica apresenta especificidade pela posição primária dos triglicérides, catalisando também a hidrólise de 1,2(2,3)-diglicérides e de 1(3)-monoglicérides. Não há efeito sobre os 2-monoglicérides^{41,42,45}. A enzima tem também ação sobre os fosfolípidos, hidrolisando a ligação primária de acetil-éster da lecitina, mas este efeito é muito discreto⁶³.

Em resumo, os quilomícrons enquanto circulam no plasma sofrem um processo de transformação que resulta em

partículas menores, contendo apenas uma proporção residual dos triglicérides iniciais. As partículas ficam com uma relação molar colesterol livre/fosfolípidos aumentada e o elenco de apolipoproteínas se modifica, mas os quilomícrons não perdem colesterol-éster na circulação. Convencionou-se chamar remanescentes de quilomícron as partículas que sofrem essas transformações. Essas partículas são mais susceptíveis de serem captadas pelo fígado do que os seus precursores, os quilomícrons, como se pode inferir de algumas experiências^{4,20,22,49} (Fig. 1).

Finalmente, com a captação dos seus remanescentes pelo fígado, encerra-se o ciclo de transporte de lípidos na circulação pelo quilomícron (Fig. 1). A captação dessas partículas pelo hepatócito se dá por um mecanismo saturável, de alta afinidade e especificidade¹¹, aparentemente mediada pela Apo E^{12,64,66,67,74}. Embora se postulasse que a Apo B também desempenha um papel nesse processo^{14,71,75}, trabalhos mais recentes contestam esta suposição^{6,27,37,54}. Em contrapartida, as apolipoproteínas C inibem a captação dos remanescentes de quilomícron⁷⁴.

Em seres humanos, o estudo do metabolismo dos quilomícrons tem sido obstado pela dificuldade de sua obtenção na linfa. Por outro lado, sua remoção plasmática é muito rápida, e os remanescentes que vão sendo formados na sua metabolização tem tamanho e densidade na mesma faixa das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e de pequenos quilomí-

crons intactos, o que inviabiliza sua recuperação no plasma (com o mínimo de pureza).

Em animais experimentais, a obtenção de quilomícrons da linfa, com marcação radioativa, é viável, embora seja um procedimento laborioso e prolongado.

Os métodos correntes de obtenção de remanescentes de quilomícron envolvem a injeção dos quilomícrons obtidos da linfa na circulação plasmática de outro animal, o qual é previamente hepatectomizado para impedir a captação dos remanescentes pelo fígado. Algum tempo depois, o plasma é colhido e ultracentrifugado para recuperação dos remanescentes de quilomícron injetados^{52,56}. Esses métodos, no entanto, apresentam os problemas que expusemos acima, produzem frações heterogêneas (mistura de quilomícrons em diversos estágios de metabolização com subfrações de VLDL), portanto, de valor fisiológico duvidoso; além de serem muito trabalhosos e de baixo rendimento.

Tendo em vista estes problemas, há dificuldade mesmo em definir o que são os remanescentes de quilomícron, tanto do ponto de vista químico como do funcional. Em um modelo teórico, poderíamos sugerir que, numa fase terminal de metabolização, os remanescentes sejam partículas não mais susceptíveis à lipólise e capazes de serem prontamente captadas pelo fígado⁵².

Um papel central na regulação do metabolismo corpóreo do colesterol é atribuído aos remanescentes de quilomí-

cron pelas evidências de serem as únicas lipoproteínas capazes de provocar uma inibição potente da síntese hepática do colesterol^{43,44,73,77}, a qual é responsável por mais de 50% da síntese do esteróide pelo organismo^{1,31,73}. Receptores específicos para remanescentes de quilomícron, além dos hepátocitos, foram descritos em fibroblastos de rato^{19,29,53} e em células endoteliais de artéria¹⁸, embora não se possa ainda avaliar o significado da importância fisiológica da captação destas partículas em tecidos periféricos⁵².

Recentemente, aproveitando-se da experiência acumulada no Instituto de Biofísica da Boston University na produção e caracterização físico-química de emulsões artificiais, REDGRAVE & MARANHÃO⁵⁴ desenvolveram emulsões na faixa de tamanho, densidade e composição química dos quilomícrons. As emulsões eram produzidas por sonicação, em meio aquoso, de lecitina, colesterol, colesteril-oleato e trioleína, seguida de ultracentrifugação em gradientes de densidade. No preparo dessas emulsões não eram incluídas as apolipoproteínas, mas os autores verificaram que, quando incubadas com o plasma de ratos, elas adquiriam todas as apolipoproteínas normalmente presentes nos quilomícrons da linfa, com exceção da Apo B, a qual é insolúvel, portanto, não passível de troca entre partículas. As emulsões, marcadas com colesteril oleato e trioleína radioativas, foram injetadas intra-arterialmente em ratos, esperando-se, portanto, que elas fossem capazes de, ao adquirirem as apolipoproteínas das lipoproteínas em circulação no

plasma do animal, reproduzirem a metabolização dos quilomícrons, tal como descrita em estudos cinéticos clássicos^{30,56}.

De fato, essas experiências demonstraram uma perfeita analogia entre as emulsões artificiais e os quilomícrons da linfa, quando injetadas na circulação sanguínea. Também nas emulsões artificiais havia geração de remanescentes, evidência da pela remoção mais rápida de triglicérides da circulação do que de colesteril-éster, o que significa lipólise periférica. As taxas de remoção de colesteril-éster e dos triglicérides e ram idênticas às dos quilomícrons da linfa. Doze minutos após a injeção, aproximadamente 50% do colesteril-éster e apenas 15% dos triglicérides se encontravam no fígado, valores compatíveis com as das experiências com quilomícrons da linfa, e que espelham a captação hepática dos remanescentes depletados em triglicérides. A captação do colesteril-éster e dos triglicérides das emulsões pelo baço era inferior a 1% , confirmando aí também o que acontece na metabolização dos qui lomícrons da linfa.

Ao aumentar progressivamente a relação molar coles terol/fosfolípides, os autores verificaram que a lipólise das partículas na circulação era simultaneamente reduzida, até que, ao se atingir a relação molar maior que 1, a lipólise era abo lida totalmente (o que é traduzido por remoção plasmática de triglicérides e colesteril-éster em taxas iguais). Neste pon- to, também as partículas eram removidas do plasma com mais ra pidez. Com esta emulsão, de relação molar colesterol/fosfolípi

des igual, os autores encontraram um tipo de partícula que se ajustava perfeitamente ao conceito de remanescentes de quilomícron: partículas que já não são passíveis de lipólise e que tem afinidade maior (pelo fígado).

Os trabalhos acima permitiram, dessa forma que se utilizem partículas artificiais para reproduzir o metabolismo dos quilomícrons, facilitando os estudos nesse campo pela obtenção por método simples e prático de frações puras, de composição química perfeitamente conhecida. O modelo das emulsões artificiais facultava a possibilidade de se variar à vontade a composição química, de forma a avaliar como cada componente influencia o metabolismo das partículas. Além do mais, há grande facilidade de marcação das partículas com radioisótopos ou marcadores fluorescentes.

O presente estudo foi delineado visando avaliar o comportamento metabólico desses dois tipos básicos de emulsões, os quilomícrons e os remanescentes de quilomícron, sob condições em que a ação da lipase lipoproteica, enzima fundamental nos processos que descrevemos, estivesse estimulada ou inibida.

A ação hiperlipemizante do Triton WR 1339, um detergente não iônico, foi descrita no início dos anos 50, verificando-se depois que esta ação se dava por impedimento da lipólise dos quilomícrons e da VLDL⁵⁸. Quando administrado a ratos, o Triton WR 1339 provoca hipertrigliceridemia exuberante e hipercolesterolemia em poucas horas, atingindo níveis má

ximos em 24 horas⁶¹ .

Os mecanismos pelos quais o Triton WR 1339 bloqueia a ação da lipase lipoproteica são um ponto polêmico na literatura. SCHOTZ e cols. propuseram que o detergente envolve a lipoproteína de tal forma que impede a ação da enzima⁶⁰ . No entanto, há a possibilidade de que o Triton possa alterar a estrutura da lipoproteína , impossibilitando a interação funcional com a enzima^{58,59}, e recentemente há sugestões de que possa promover o bloqueio por ação direta sobre a lipase lipoproteica^{8,65}.

Igualmente, a protamina inibe a ação da lipase lipoproteica sobre o quilomícron , produzindo hiperlipemia^{3,24} . Este efeito, no entanto, é menos intenso do que o do Triton WR 1339²⁴ .

A heparina, pelo contrário, tem uma potente ação lipolítica, na circulação plasmática, demonstrada pela primeira vez por HAHN, em 1943²³ . Sua ação se dá liberando a lipase lipoproteica - que se encontra ligada à superfície das células endoteliais - para a circulação sanguínea^{15,46,68} . Sabe-se que a heparina se liga à enzima por ligação iônica, o que a torna mais estável e solúvel⁴⁷ , mas não tem efeito na atividade catalítica da lipase lipoproteica⁴⁶ .

Neste trabalho, quilomícrons e remanescentes de quilomícron artificiais marcados com colesteril-éster e triglicérides radioativos foram injetados intra-arterialmente em ratos tratados com Triton WR 1339, protamina, heparina e em

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

ratos controle. Como o colesteril-éster não é removido independentemente das partículas enquanto elas circulam no plasma, a medida da remoção plasmática deste componente traduz a remoção das próprias partículas. A intensidade da lipólise que essas partículas sofrem na circulação sanguínea, antes de serem captadas pelos órgãos (fígado principalmente), foi medida por um "índice de lipólise" calculado a partir da remoção plasmática dos triglicérides e colesteril éster³⁸.

Estas manobras farmacológicas produziram efeitos acentuados na remoção plasmática e na lipólise dos quilomícrons artificiais, mas pouco ou nada afetaram o metabolismo dos remanescentes de quilomícron artificiais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Os lípides puros, trioleína, colesteril oleato e colesterol foram adquiridos da Nu-Chek Prep. (Elysian, E.U.A.) e a fosfatidilcolina (lecitina do ovo) da Lipid Products (Surrey, Inglaterra). O gliceriltri -[9,10(N)-³H] oleato e o colesteril-(1-¹⁴C) oleato foram obtidos da Amersham International (Amersham, Inglaterra). O Triton WR 1339 e o sulfato de protamina foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, E.U.A.) e a heparina da Hoffman La Roche Co. (Nutley, E.U.A.). Os solventes e reativos foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, R.J.) e Sigma Chemical Company (St. Louis, E.U.A.).

2.2. Métodos

2.2.1.1. Preparo dos quilomícrons artificiais

Colesterol, colesteril oleato, Lecitina e trioleína dissolvidos em clorofórmio/metanol (2:1) foram colocados em frasco de contagem nas proporções estabelecidas (Tabela 1), acrescentando-se aí os isótopos radioativos: gliceriltri [9,10(N)-³H] oleato e colesteril-(1-¹⁴C) oleato. Esta mistura de

lípides foi seca sob fluxo de nitrogênio e mantida no dessecador a vácuo por uma noite, a 4°C, para completa evaporação dos solventes residuais. Em seguida, foi sonicada em 6 mL de solução de cloreto de sódio de densidade 1,101g/mL em pH 7,0, contendo 0,01% de etilenodiaminotetracetato de sódio (EDTA sódico). A sonicação foi feita com potência de 70-80 Watts, em modo contínuo, sob fluxo de nitrogênio e em banho de água (25°C) durante 30 minutos, sendo utilizado sonicador Branson Cell Disruptor mod. B-30 com ponta de 1 cm de diâmetro (Branson Sonifier, São Paulo). Para se obter os quilomícrons na faixa de diâmetro e densidade desejada, a emulsão foi submetida a 2 etapas de ultracentrifugação (centrífuga Beckman, mod. L₃ 50, rotor SW 41) em gradiente descontínuo de densidade⁵⁵, utilizando-se solução de Cloreto de Sódio com densidades de 1,065, 1,020, 1,006g/mL, pH 7,0 contendo 0,01% de EDTA sódico. Os volumes no tubo de ultracentrífuga foram distribuídos em 3,0 mL da emulsão (d = 1,101g/mL), 3,0 mL da solução de densidade 1,065g/mL, 3,0 mL da solução 1,020g/mL e 2,5 mL da solução de densidade 1,006g/mL totalizando um volume de 11,5 mL. O sobrenadante resultante da primeira ultracentrifugação (12.000 r.p.m. durante 15 minutos a 22°C) continha partículas com diâmetros maiores do que o desejado, sendo portanto desprezado. O volume retirado foi repostado com solução salina de densidade 1,006g/mL. Após a segunda ultracentrifugação (36.000r.p.m. durante 25 minutos a 22°C), obteve-se por aspiração o sobrenadante que continha as partículas de densidade e diâmetro dese-

jado, que foi utilizado no estudo.

2.2.1.2. Preparo de remanescentes de quilomícron artificiais

As proporções dos componentes das misturas de lípi-
des para o preparo dos remanescentes de quilomícrons estão na
Tabela 1. As etapas do preparo foram semelhantes aos dos qui-
lomícrons, com modificações nos procedimentos descritos a se-
guir: a sonicação dos lípides foi feita com 8mL de solução de
cloreto de sódio de densidade 1,101g/mL durante 60 minutos em
banho de água a 37°C. Na ultracentrifugação, o gradiente des-
contínuo de densidade foi de 4,0mL de emulsão ($d = 1,101\text{g/mL}$),
2,8 mL de solução de densidade 1,065g/mL, 2,7 mL de solução
de densidade 1,020g/mL e 2,6 mL de solução de densidade 1,006
g/mL, totalizando 12,1 mL de volume. A primeira etapa da ul-
tracentrifugação foi realizada a 10.000 r.p.m. durante 20 mi-
nutos a 22°C e a segunda etapa a 38.000 r.p.m. durante 30 mi-
nutos a 22°C.

Fig. 2

FLUXOGRAMA PARA PREPARO DE EMULSÕES

2.2.2. Análise dos constituintes das emulsões

Os triglicérides, fosfolípidos, colesterol e colesteril oleato foram determinados respectivamente pelos métodos de SOLONI⁷⁰, ZILVERSMIT⁷⁸ e ZLATKIS & ZAK⁷⁹. A separação do colesterol livre do colesterol esterificado foi realizada em cromatografia de camada delgada utilizando-se sílica Gel H em sistema de solvente contendo hexana: éter etílico : ácido acético (70:30:1). O diâmetro médio das partículas de quilomícrons foi obtido indiretamente a partir da composição percentual dos triglicérides, fosfolípidos e colesteril-éster, de acordo com MILLER & SMALL³⁹.

2.3. Estudos "in vivo" da remoção plasmática das emulsões.

Foram utilizados ratos machos de raça WISTAR, com peso entre 250 e 350 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os ratos foram anestesiados com éter etílico e submetidos à canulação da artéria carótida utilizando-se catéteres previamente siliconizados (catéter PE-50, Clay Adams, E.U.A. e silicone Pronto-sil, Flvmen, Volta Redonda, R.J.) para evitar a coagulação do sangue. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas de restrição tipo BOLLMAN, e aí mantidos durante a recuperação da anestesia (mínimo 60 minutos) e a execução subsequente do experimento.

2.4. Protocolo das Experiências

Foram realizados experimentos injetando-se os quilomícrons artificiais por via intra-arterial, em 4 grupos de animais: grupo controle, e grupos tratados com sulfato de protamina (200 mg/animal), Triton WR 1339 (600mg/kg de peso) e heparina (250 UI/kg de peso).

Experimentos com injeção intra-arterial de remanescentes de quilomícrons artificiais foram realizados em 3 grupos de animais: grupo controle, e grupos tratados com Triton WR 1339 (600mg/kg de peso) e heparina (250 UI/kg de peso). Essas drogas foram administradas 10 minutos antes da injeção das emulsões artificiais. Amostras de sangue (0,4 mL) foram colhidas da artéria após a administração das emulsões, em intervalos de 2 minutos durante 10 minutos, em tubos Eppendorf de 0,5 ml contendo 25UI de heparina.

2.5. Processamento das amostras de plasma

Alíquotas de 0,1 mL de plasma foram extraídas com metanol/clorofórmio/água (2,5/5,0/2,5 mL) por uma noite²¹. A fase orgânica (4,5 mL) mais uma solução carreadora de colesterol oleato e gliceril trioleato (100 µg) foram secas sob fluxo de nitrogênio. Os lípides assim extraídos foram submetidos à cromatografia em camada delgada em sílica Gel H., com o sistema de fase móvel contendo hexana:éter etílico:ácido acético

(70:30:1, V/V/V). As bandas cromatográficas correspondentes aos triglicérides e colesteril-éster foram raspadas para dentro dos frascos de cintilação, adicionando-se 7 mL de solução cintiladora (5 g de PPO, 0,5 g de dimetil POPOP, 333 mL de Triton X-100 e q.s.p. 1.000 mL de tolueno)³². A radioatividade foi medida em contador Beckman mod. LS 100 nos canais de trício (³H) e carbono 14 (¹⁴C).

2.6. Estatística e Cálculos

2.6.1. Estatística

Para o estudo estatístico utilizou-se o teste "t" de Student para amostras pareadas e para duas médias⁶⁹.

2.6.2. Cálculos

2.6.2.1. Cálculo da Taxa fracional de remoção (TRF)

A taxa fracional de remoção foi calculada segundo a fórmula ³⁸:

$$TRF = \ln 2 / T_{\frac{1}{2}} \quad \text{min}^{-1}$$

2.6.2.2. Cálculo do Índice de Lipólise

O índice de lipólise foi calculada segunda a fórmu

la³⁸ :

$$\text{Índice de lipólise} = \text{TFR}_{\text{TG}} - \text{TFR}_{\text{CE}}$$

3. RESULTADOS

A tabela 1 mostra a composição das duas misturas de lipídes e das emulsões resultantes obtidas após a sua sonicação e ultracentrifugação.

Quando os quilomícrons artificiais marcados isotopicamente foram injetados via intra-arterial em ratos controle, a remoção plasmática (medida como taxa fracional de remoção, TFR) do colesteril-éster foi menor que a dos triglicérides ($p < 0,001$). Isto indica que ocorreu hidrólise dos triglicérides das partículas enquanto elas circulavam no plasma³⁷ (Índice de Lipólise = $0,09 \pm 0,01$, Tab. 2, Fig. 3). Ao contrário, quando foram injetados os remanescentes de quilomícron artificiais, não houve diferença significativa entre a remoção plasmática do colesteril-éster e dos triglicérides (Tab. 3, Fig. 5), demonstrando-se assim que neste caso a lipólise não ocorreu⁵⁴. Comparando-se as taxas de remoção plasmática de colesteril-éster dos remanescentes com a dos quilomícrons artificiais, verifica-se que a dos remanescentes foi duas vezes maior ($p < 0,001$), indicando que estas partículas são removidas do plasma com maior velocidade que os quilomícrons.

Quando os quilomícrons artificiais foram injetados nos ratos tratados com sulfato de protamina, a remoção plasmática das partículas foi a metade da obtida no grupo controle ($p < 0,001$, Tab. 2, Fig. 3). A remoção dos triglicérides foi tam

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DAS EMULSÕES ARTIFICIAIS OBTIDAS A PARTIR DA SONICAÇÃO DE MISTURAS
DE LÍPIDES

	CONSTITUINTES (mg%) ⁺				RELAÇÃO MOLAR		DIÂMETRO DA PARTÍCULA**
	CL	FL	CE	TG	CL/FL	CE/TG	
Quilomícron artificial n=8	1,9±0,3 (2)	10,4±1,3 (23)	11,2±3,0 (6)	76,5±4,1 (69)	0,39±0,06	0,13±0,01	1000Å
Remanescente de Quilomícron Artificial n=5	21,3±2,7 (24,5)	18,7±2,4 (24,5)	18,7±5,4 (10,3)	41,4±3,4 (40,7)	2,4±0,5	0,67±0,2	

+ valores médios ± erro padrão da média.

** Diâmetro aproximado da partícula segundo MILLER & SMALL ³⁹.

Os números entre parênteses referem-se à composição da mistura de lípidos

CL - Colesterol

FL - Fosfolípidos

CE - Colesteril-éster

TG - Triglicérides

TABELA 2: REMOÇÃO PLASMÁTICA DO COLESTERIL-(1-¹⁴C) OLEATO E GLICERILTRI [9,10(N)-³H]OLEATO
DOS QUILOMÍCRONS ARTIFICIAIS INJETADOS INTRA-ARTERIALMENTE EM RATOS CONTROLE E
TRATADOS COM SULFATO DE PROTAMINA*, TRITON WR 1339** E HEPARINA***

Grupos Experimentais	Taxa Fracional de Remoção ****		Índice de Lipólise (TFR _{TG} - TFR _{CE})
	$\ln 2/T_{\frac{1}{2}}$	(min ⁻¹)	
	¹⁴ C-CE	³ H-TG	
controle	0,11±0,010 (n=8)	0,19±0,02 (n=9)	0,09±0,01 (n=8)
sulfato de Protamina	0,05±0,01 ⁺⁺ (n=5)	0,10±0,01 ⁺⁺ (n=5)	0,05±0,01 ⁺ (n=5)
Triton WR 1339	0,03±0,00 ⁺⁺ (n=8)	0,03±0,00 ⁺⁺ (n=9)	zero ⁺⁺ (n=8)
Heparina	0,25±0,02 ⁺⁺ (n=10)	.. (n=10)	.. (n=10)

¹⁴C-CE - colesteril-(1-¹⁴C)oleato

³H-TG - gliceril tri[9,10(N)-³H]oleato

TFR_{TG} - Taxa fracional dos triglicérides

TFR_{CE} - Taxa fracional do colesteril éster

* 200 mg/animal

** 600 mg/kg peso

*** 250 UI/kg peso

**** valor médio±erro padrão da média

.. valor impossibilitado de calcular
devido à rápida remoção plasmática

+ p<0,005

++ p<0,001 em relação ao controle

Fig. 3 - Remoção plasmática do colesterol-(1- ^{14}C)oleato (—●—) e gliceriltri[9,10(N)- ^3H]oleato (---○---) dos quilomícrons artificiais injetados intra-arterialmente em ratos controle e tratados com sulfato de protamina (200 mg/animal) e Triton WR 1339 (600 mg/kg peso).

Fig. 4 - Remoção plasmática do colesteril-(1- ^{14}C)oleato (—●—) e gliceriltri [9,10(N)- ^3H] oleato (---○---) dos quilomícrons artificiais injetados intra-arterialmente em ratos controle e tratados com heparina (250 UI/kg peso).

TABELA 3: REMOÇÃO PLASMÁTICA DO COLESTERIL-(1-¹⁴C)OLEATO E GLICERILTRI [9,10(N)-³H]OLEATO
DOS REMANESCENTES DE QUILOMÍCRON ARTIFICIAIS INJETADOS INTRA-ARTERIALMENTE EM
RATOS CONTROLE E TRATADOS COM TRITON WR 1339* E HEPARINA**

Grupos Experimentais	Taxa Fracional de Remoção †		Índice de Lipólise † (TFR _{TG} - TFR _{CE})
	$\ln 2/T_{\frac{1}{2}}$ ¹⁴ C-CE	(min ⁻¹) ³ H-TG	
controle	0,23±0,03 (n=12)	0,26±0,03 (n=23)	0,01±0,01 (n=12)
Triton WR 1339	0,22±0,02 ⁺ (n=7)	0,23±0,02 ⁺ (n=13)	zero (n= 7)
Heparina	0,24±0,02 ⁺ (n=7)	0,32±0,04 ⁺⁺ (n=7)	0,08±0,02 ⁺⁺ (n=7)

¹⁴C-CE - colesteril-(1-¹⁴C)oleato

³H-TG - gliceril-tri[9,10(N)-³H]oleato

TFR_{TG} - Taxa fracional de remoção dos triglicérides

TFR_{CE} - Taxa fracional de remoção do colesteril oleato

† Valor médio ± erro padrão da média

+ não significativo em relação ao controle

++ p<0,005 em relação ao controle

* 600 mg/kg peso

** 250 UI/kg peso

81097

Fig. 5 - Remoção plasmática do colesterol-(1-¹⁴C) oleato (—●—) e gliceriltri[9,10(N)-³H]oleato (---○---) dos remanescentes de quilomícron artificiais injetados intra-arterialmente em ratos controle e tratados com Triton WR 1339 (600 mg/kg peso).

bém reduzida ao meio ($p < 0,001$), ocorrendo diminuição da lipólise (Índice de lipólise = $0,05 \pm 0,01$). Efeitos ainda mais intensos foram obtidos nos ratos tratados com Triton WR 1339: a remoção plasmática das partículas foi ainda menor que a dos ratos tratados com protamina ($p < 0,001$), bem como a remoção dos triglicérides ($p < 0,001$). Comparando-se as taxas de remoção plasmática de colesteril-éster com a de triglicérides, verifica-se que elas foram exatamente iguais após Triton WR 1339, demonstrando que a lipólise das partículas na circulação plasmática foi completamente abolida por esta droga (Índice de Lipólise = zero, Tab. 2, Fig. 3).

Por outro lado, a injeção dos quilomícrons artificiais nos ratos tratados com heparina resultou numa remoção de triglicérides tão rápida, que não foi possível calcular a taxa fracional de remoção, uma vez que já no primeiro tempo de colheita de sangue (tempo de 2 minutos) não havia radioatividade detectável na fração triglicérides. Concomitantemente, a remoção das partículas foi também mais rápida do que a do grupo controle ($p < 0,001$, Tab. 2, Fig. 4).

Em contraste evidente com os quilomícrons, o tratamento com Triton WR 1339, não alterou a metabolização dos remanescentes de quilomícron artificiais: a remoção plasmática do colesteril-éster e dos triglicérides não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com os controles (Tab. 3, Fig. 5).

Igualmente, o tratamento com heparina não alterou a remoção plasmática dos remanescentes e também a remoção dos tri

glicérides em relação ao controle (Tab. 3, Fig. 5, N.S.). No en tanto, a heparina promoveu um certo grau de lipólise nos remanescentes artificiais (Índice de lipólise = $0,08 \pm 0,02$), com a remoção de triglicérides mais rápida que a do colesteril-éster ($p < 0,005$), que como já vimos, não foi observada nos ratos controles.

4. DISCUSSÃO

Como vimos, a metabolização dos quilomícrons se dá em dois passos: 1) hidrólise dos triglicérides pela ação da lipase lipoproteica e 2) captação das partículas depletadas em triglicérides, os remanescentes de quilomícron, pelo fígado. A segunda etapa é dependente da primeira: nas condições que resultam em inibição da atividade enzimática, a captação hepática é deficiente e há acúmulo de quilomícrons na circulação^{26,36,52}. Isto foi claramente demonstrado em ratos com diabetes induzido por Streptozotocina - onde a atividade da lipase está diminuída⁵⁷ - e em situações de inibição farmacológica da enzima, como no uso de Triton WR 1339 ou sulfato de protamina^{3,24,48,61,65}. Além do mais, experiências com o sistema de perfusão de fígado isolado mostram que os quilomícrons tem uma capacidade bem menor que os seus produtos, os remanescentes, de serem captados pelo fígado^{16,27}.

A inibição da atividade da lipase lipoproteica, induzida neste trabalho pela administração de Triton WR 1339 e sulfato de protamina, provocou nos quilomícrons artificiais as mesmas alterações de metabolização descritos nas experiências que utilizaram quilomícrons naturais, obtidos da linfa: à diminuição acentuada da lipólise seguiu-se a remoção lenta das partículas da circulação, refletindo a baixa afinidade dos receptores do hepatócito por partículas que não foram sufici-

entamente expostas à ação enzimática. Também consentâneo com a literatura dos quilomícrons naturais é o achado neste trabalho de que o efeito do Triton é mais potente que o da protamina²⁴, produzindo uma inibição mais efetiva da lipólise acompanhada de um retardo maior na remoção plasmática das partículas.

Na contraprova dessas experiências, ou seja, no estímulo da ação da lipase lipoproteica pelo tratamento com heparina, a lipólise foi tão intensa e brusca que no primeiro tempo de colheita de plasma (2 minutos) os triglicérides das partículas já estavam ausentes do plasma. Congruentemente, a remoção plasmática das partículas foi aumentada: a geração muito mais rápida de remanescentes, promovida pela heparina deve ter propiciado a oferta ao fígado, de um maior número de partículas, por unidade de tempo, com afinidade ótima pelos receptores hepáticos.

Por conseguinte, na vigência tanto de estímulo quanto de inibição da lipase lipoproteica, os quilomícrons artificiais apresentaram um comportamento metabólico idêntico aos quilomícrons obtidos da linfa.

Realmente, partindo-se da concepção teórica de remanescentes de quilomícron - partículas que já sofreram o processo de metabolização na circulação sistêmica e estão com afinidade máxima pelos receptores hepáticos - é de se supor que a interferência na atividade da lipase não altere a sua captação pelo fígado.

A utilidade prática de se dispor de um tipo de partícula artificial que dispense o catabolismo periférico para ter uma afinidade ótima pelos receptores fica, então, evidente: é possível, agora, discernir perfeitamente defeitos de interação a nível de receptor das alterações produzidas por deficiências da ação da lipase lipoproteica.

Por exemplo, pode-se suspeitar que o Triton WR1339, que de acordo com a literatura se liga às lipoproteínas⁶⁰, além de impedir a ação da lipase interfira na ligação lipoproteína-receptor, provocando um retardo na remoção plasmática das partículas em adição ao que já existe pela diminuição da lipólise.

Por outro lado, essas manobras farmacológicas em pouco ou nada afetaram a remoção do colesteril-éster e triglicérides dos remanescentes artificiais, em flagrante contraste com os resultados dos quilomícrons artificiais. A remoção das partículas permanece inalterada tanto na administração de Triton WR 1339 quanto na de heparina. Um fato a ser realçado é que a heparina provocou uma discreta lipólise nas partículas quando nos controles a lipólise havia sido nula. No entanto, a ocorrência de lipólise não se traduziu em remoção mais acelerada das partículas, indicando que já nas condições do controle a afinidade das partículas pelo receptor hepático era máxima.

Não há na literatura experiências descrevendo o comportamento metabólico dos remanescentes em condições de i-

nibição da atividade da lipase lipoproteica. Recentemente, descreveu-se a remoção plasmática de remanescentes na vigência de heparina em seres humanos⁵, utilizando-se métodos de marcação de quilomícrons com retinol, e os resultados corroboram os obtidos neste trabalho, ou seja, a heparina não aumentou a remoção plasmática dos remanescentes. Portanto, o uso dos remanescentes artificiais funciona como um teste da interação lipoproteína-receptor e os valores normais encontrados de remoção plasmática dos remanescentes no grupo de ratos tratados com Triton WR 1339 sugere fortemente que esta droga não afete diretamente a ligação das partículas com os receptores.

Assim, os resultados deste trabalho corroboram a hipótese de que os quilomícrons e os remanescentes de quilomí cron artificiais reproduzem o comportamento metabólico esperado das partículas naturais. Além disso, eles tornam possível estudos sobre a influência da lipase lipoproteica no metabolismo dos quilomícrons utilizando o modelo das emulsões artificiais.

5. CONCLUSÕES

- O tratamento com Triton WR 1339 abole completamente a lipólise e diminui a remoção plasmática dos quilomícrons artificiais.
- Os efeitos de diminuição da lipólise e da remoção plasmática dos quilomícrons são menos intensos no tratamento com sulfato de protamina, comparados aos do Triton WR 1339.
- A ação de estimulação da heparina sobre a atividade da lipase lipoproteica resulta em lipólise instantânea nos quilomícrons artificiais, acelerando a remoção plasmática dessas partículas.
- O Triton WR 1339 e a heparina não modificam a remoção plasmática dos remanescentes de quilomícrons artificiais.
- A heparina produz uma lipólise discreta nos remanescentes de quilomícron artificiais.
- Portanto, diante das manobras farmacológicas utilizadas que modificam a atividade da lipase lipoproteica, as partículas artificiais apresentam comportamento capaz de explicar o metabolismo postulado para o quilomícron natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ANDERSEN, J.M. & DIETSCHY, J.M. Regulation of sterol synthesis in 16 tissues of the rat. I. Effect of diurnal light cycling fasting, manipulation of enterohepatic circulation, and administration of chylomicrons and Triton. J. Biol. Chem., Baltimore, 252:3646-51, 1977.
02. BENSADOUN, A.; EHNHOLM, C.; STEINBERG, D. & BROWN, W.V. Purification and characterization of lipoprotein lipase from pig adipose tissue. J. Biol. Chem., Baltimore, 249:2220-27, 1974.
03. BERGER, G.M.B. & ABRAHAM, P.R. Selective protamine sulphate inactivation of lipoprotein lipase and hepatic lipase in human post-heparin plasma: specific lipase levels in normal and in type I hyperlipoproteinaemia. Clin. Chem. Acta, Amsterdam, 81:219-28, 1977.
04. BERGMAN, E.N.; HAVEL, R.J. WOLFE, B.M. & BÖHMER, T. Quantitative studies of metabolism of chylomicron triglycerides and cholesterol by liver and extrahepatic tissues of sheep and dogs. J. Clin. Invest., New York, 50:1831-39, 1971.
05. BERR, F. ECKEL, R. & KERN JR., F. Plasma decay of chylomicron remnants is not affected by heparin-stimulated plasma lipolytic activity in normal fasting man. J. Lipid Res., Bethesda, 26:852-59, 1985.
06. BORENSZTAJN, J.; GETZ, G.S.; PADLEY, R.J. & KOTLAR, T.J. The

- apoprotein B-independent hepatic uptake of chylomicron remnants. Biochem. J., London, 204:609-12, 1982.
07. BORENSZTAJN, J. & ROBINSON, D.S. The effect of fasting on the utilization of chylomicron triglyceride fatty acids in relation to clearing factor lipase (lipoprotein lipase) releasable by heparin in the perfused rat heart. J. Lipid Res., Bethesda, 11:111-17, 1970.
 08. BORENSZTAJN, J.; RONE, M.S. & KOTLAR, T.J. The inhibition "in vitro" of lipoprotein lipase (clearing factor lipase) activity by Triton WR 1339. Biochem. J., London, 156:539-43, 1976.
 09. BRECKENRIDGE, W.C.; LITTLE, J.S.; STEINER, G.; CHOW, A. & POAPST, M. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein CII. N. Engl. J. Med., Boston, 298:1265-73, 1978.
 10. BROWN, W.V. & BAGINSKY, M.C. Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of very low density lipoprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 46:375-82, 1972.
 11. BROWN, M.S. & GOLDSTEIN, J.L. Lipoprotein receptors in the liver: control signals for plasma cholesterol traffic. J. Clin. Invest., New York, 72:743-47, 1983.
 12. COOPER, A.D.; ERICKSON, S.K.; NUTIK, R. & SHREWSBURY, M. A. Characterization of chylomicron remnant binding to rat liver membranes. J. Lipid Res., Bethesda, 23:42-52, 1982.
 13. EISENBERG, S. & LEVY, R. I. Lipoprotein metabolism. Adv. Lipid Res., New York, 13:1-89, 1975.

14. ELDVSON, J.;HUANG, Y.D.;BAKER, N. & KANNAN, R. Apolipoproteins B is structurally and metabolically heterogeneous in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci., Washington,78:157-61, 1981.
15. ENGELBERG, H. Heparin and atherosclerosis. A review of old and recent findings. Am. Heart J., Saint Louis,99(3): 359-72, 1980.
16. FELTS, J.M. & MAYES, P.A. Lack of uptake and oxidation of chylomicron triglyceride to carbon dioxide and ketone bodies by the perfused rat liver. Nature, London,206:195-96, 1965.
17. FIELDING, C.J. Lipoprotein lipase: Evidence for high and low affinity enzyme sites. Biochemistry, Washington, 15: 879-84 , 1976.
18. FLORÉN, C.H.; ALBERS, J.J. & BIERMAN, E.L. Uptake of chylomicron remnants causes cholesterol accumulation in cultured human arterial smooth muscle cells.Biochim.Biophys. Acta., Amsterdam, 663:336-49, 1981.
19. FLORÉN, C.H.; ALBERS, J.J.; KUDCHODKAR, B.J. & BIERMAN, E.L. Receptor-dependent uptake of human chylomicron remnants by culture skin fibroblasts. J. Biol. Chem., Baltimore, 256:425-33, 1981.
20. FLORÉN, C.H. & NILSSON, A. binding interiorization and degradation of cholesteryl ester-labelled chylomicron-remnant particles by rat hepatocyte monolayers. Biochem. J., London, 168:483-94, 1977.

21. FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., Baltimore, 226:497-509, 1957.
22. GOODMAN, D.S. The metabolism of chylomicron cholesterol ester in the rat. J. Clin. Invest., New York, 41:1886-96 , 1962.
23. HAHN, P.F. Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. Science, New York, 98:19, 1943.
24. HARWOOD, J.L.; RILEY, S.E. & ROBINSON, D.S. The action of protamine on clearing factor lipase and on plasma triglyceride metabolism. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 337: 225-38, 1974.
25. HAVEL, R.J.; FIELDING, C.J.; OLIVECRONA, T.; SHORE, V. G. FIELDING, P.E. & EGELRUD, T. Cofactor activity of protein components of human very low density lipoprotein in the hydrolysis of triglycerides by lipoprotein lipase from different sources. Biochemistry, Washington, 12:1828-33 , 1973.
26. HAVEL, R.J. & GORDON, R.S. Idiopathic hyperlipemia: metabolic studies in affected family. J. Clin. Invest., New York, 39:1777-90, 1960.
27. HUI, O.Y.; INNERARITY, T.L.; MILNE, R.W.; MARCEL, Y. L. & MAHLEY, R.W. Binding of chylomicron remnants and β very low density lipoprotein to hepatic and extrahepatic lipoprotein receptors. J. Biol. Chem., Baltimore, 259:15060 -68, 1984.

28. IMAIZUMI, K.; FAINARU, M.; HAVEL, R.J. Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum protein. J. Lipid Res., New York, 19:712-22, 1978.
29. INNERARITY, T.L.; PITAS, R.E.; MAHLEY, R.W. Disparities in the interaction of rat and human lipoproteins with culture rat fibroblasts and smooth muscle cells. J. Biol. Chem., Baltimore, 255:1163-72, 1980.
30. JEFFERY, F. & REDGRAVE, T.G. Chylomicron catabolism differs between hooded and albino rats. J. Lipid Res., Bethesda, 23:154-60, 1982.
31. JESKE, D.J. & DIETSCHY, J.M. Regulation of rats of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass in the rat measured using [^3H] water. J. Lipid Res., Bethesda, 21:364-76, 1980.
32. KOBAYASHI, Y. & MAUDSLEY, D.V. Biological Applications of liquid scintillation counting. New York, Academic Press, 1974.
33. KRAUSS, R.M.; HERBERT, P.N.; LEVY, R.I. & FREDRICKSON, D. S. Further observations on the action and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. Circ. Res., New York, 33:403-11, 1973.
34. LA ROSA, J.C.; LEVY, R.I.; HERBERT, P.; LUX, S.E. & FREDRICKSON, D.S. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 41:57-62, 1970.

35. LINDER, C.; CHERNICK, S.S.; FLECK, T.R. & SCOW, R.D. Lipo-protein lipase and uptake of chylomicron triglyceride by skeletal muscle of rats. Am. J. Physiol., Bethesda, 231: 860-64 , 1976.
36. MAGILL, P.; RAD, S.N.; MILLER, N.E.; NICOLL, S.; BRUNZELL, J. & LEWIS, B. Relationships between the metabolism of high-density and very-low-density lipoprotein in man: studies of apolipoprotein kinetics and adipose tissue lipoprotein lipase. Eur. J. Clin. Invest., Oxford, 12:113-20, 1982.
37. MARANHÃO, R.C.; LINCOLN, E.C.; BRUNENGRABER, H.; SMALL, D.S. & REDGRAVE, T.G. The clearance of lipid recombinant lipoproteins models resembling chylomicron of their remnants. Circulation, New York, 70(II):315 , 1984 (Abst.).
38. MARANHÃO, R.C.; TERCYAK, A.M. & REDGRAVE, T.G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoprotein. Biochim. Biophys. Acta, "in press".
39. MILLER, K.W. & SMALL, D.M. Triolein-cholesteryl oleate-cholesterol-lecitin. Emulsions: Structural models of triglyceride-rich lipoproteins. Biochemistry, Washington, 22: 443-51, 1983.
40. MJOS, Q.D.; FAERGEMAN, O.; HAMILTON, R.L. & HAVEL, R.J. Characterization of remnants produced during the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in blood plasma and intestinal lymph in the rat. J. Clin. Invest., New York, 56: 603-15 , 1975.

41. MORLEY, N. & KUKSIS, A. Positional specificity of lipoprotein lipase. J. Biol. Chem., Baltimore, 247:6389-93, 1972.
42. MORLEY, N.H.; KUKSIS, A.; BUCHNEA, D. & MYHER, J.J. Hydrolysis of diacylglycerols by lipoprotein lipase. J. Biol. Chem., Baltimore, 250:3414-18, 1975.
43. NERVI, F.O. & DIETSCHY, J.M. The mechanisms of and the interrelationship between bile acid and chylomicron-mediated regulation of hepatic cholesterol synthesis in the liver of the rat. J. Clin. Invest., New York, 61:895-909, 1978.
44. NERVI, F.O.; WEIS, H.J. & DIETSCHY, J.M. The kinetic characteristics of inhibition of hepatic cholesterologenesis by lipoproteins of intestinal origin. J. Biol. Chem., Baltimore, 250:4145-51, 1975.
45. NILSSON-EHLE, P.; EGELRUD, T.; BELFRAGE, P.; OLIVECRONA, T. & BORGSTRÖM, B. Positional specificity of purified milk lipoprotein lipase. J. Biol. Chem., Baltimore, 248:6734-37, 1973.
46. OLIVECRONA, T.; BENGTSSON, G.; MARKLUND, S.E.; LINDAHL, U. & HOOK, M. Heparin-lipoprotein lipase interactions. Fed. Proc., Washington, 36(1):60-5, 1977.
47. OLIVECRONA, T. & EGELRUD, T. Evidence for an ionic binding of lipoprotein lipase to heparin. Biochem. Biophys. Res. Comm., New York, 43(3):524-29, 1971.
48. OTWAY, S. & ROBINSON, D.S. The effect of a non-ionic detergent (TRITON WR 1339) on the removal of triglyceride fat-

- ty acids from the blood of the rat. J. Physiol., London, 170:309-19 , 1967.
49. QUARFORDT, S.H. & GOODMAN, D.S. Metabolism of doubly-labeled chylomicron cholesteryl esters in the rat. J. Lipid Res., Bethesda, 8:264:73, 1967.
 50. QUARFORDT, S.H.; MICHALOPOULOS, G. & SCHIRMER, B. The effect of human C apolipoproteins on the in vitro hepatic metabolism of triglyceride emulsions in the rat. J. Biol. Chem., Baltimore, 257(24):14642-47, 1982.
 51. REDGRAVE, T.G. Formation of cholesteryl rich-particulate lipid during metabolism of chylomicron. J. Clin. Invest., New York, 49:465-71, 1970.
 52. REDGRAVE, T.G. Formation and metabolism of chylomicrons. Int. Rev. Physiol., Baltimore, 28:103-30, 1983.
 53. REDGRAVE, T.G.; FIDGE, N.H. & YIN, J. Specific saturable binding and uptake of rat chylomicron remnants by rat skin fibroblasts. J. Lipid Res., Bethesda, 23:638-44 , 1982.
 54. REDGRAVE, T.G. & MARANHÃO, R.C. Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 835:104- 12, 1985.
 55. REDGRAVE, T.G.; ROBERTS, D.C.K. & WEST, C.E. Separation of plasma lipoprotein by density gradient ultracentrifugation. Anal. Biochem., New York, 65:42-9, 1975.
 56. REDGRAVE, T.G. & SMALL, D.M. Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons

- in the rat. J. Clin. Invest., New York, 64:162- 71, 1979.
57. REDGRAVE, T.G. & SNIBSON, D.A. Clearance of chylomicron triacylglycerol and cholesteryl ester from the plasma of streptozotocin-induced diabetic and hypercholesterolemic hypothyroid rats. Metabolism, New York, 26:493-503, 1977.
 58. SCANU, A. & ORIENTE, P. Triton hyperlipemia in dogs I. In vitro effects of the detergent on serum lipoproteins and quilomicrons. J. Exp. Med., Baltimore, 113:735- 57, 1961.
 59. SCANU, A. & ORIENTE, P.; SZAJEWSKI, J.M.; Mc CORMACK, L.J. & PAGE, I.H. Triton hyperlipemia in dogs. II. Atherosclerosis diffuse lipidosi and depletion of fat stores produces by prolonged administration of the non-ionic surface active agent. J. Exp. Med., Baltimore, 114:279- 93, 1961.
 60. SCHOTZ, M.C.; SCANU, A. & PAGE, I.H. Effect of Triton on lipoprotein lipase of rat plasma. Am. J. Physiol., Bethesda, 188(2):399-402, 1957.
 61. SCHURR, P.E.; SCHULTZ, J.R. & PARKINSON, T.M. Triton-induced hyperlipidemia in rats as an animal model for screening hypolipidemic drugs. Lipids, Champaign, 7:68-74, 1972.
 62. SCOW, R.O.; BLANCHETTE-MACKIE, E.J. & SMITH, L.C. Role of capillary endothelium in the clearance of chylomicrons. A model for lipid transport from blood by lateral diffusion in cell membranes. Circ. Res., New York, 39:149- 62, 1976.
 63. SCOW, R.O. & EGELRUD, T. Hydrolysis of chylomicron phosphatidylcholine in vitro by lipoprotein lipase, phospholipase A₂ and phospholipase C. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam,

431:538- 49,1976.

64. SHELBURNE, F.; HANKS, J.; MEYERS, W. & QUARFORDT, S.H. Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. J. Clin. Invest., New York, 65:652- 58,1980.
65. SHEORAIN, V.S.; NAGESWARARAO, T. & SUBRAHMANYAM, D. On the inhibition of lipoprotein lipase by Triton WR 1339. Enzyme, Basel, 25:81- 6, 1980.
66. SHERRILL, B.C. & DIETSCHY, J.M. Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicron by the liver. J. Biol. Chem., Baltimore, 253:1859- - 67, 1977.
67. SHERRILL, B.C.; INNERARITY, T.L. & MAHLEY, R.W. Rapid hepatic clearance of canine lipoproteins containing only the E apoprotein by high-affinity receptor. Identity with the chylomicron remnant transport process. J. Biol.Chem., Baltimore, 255:1804- 07, 1980.
68. SHIMADA, K.; GILL, P.J.; SILBERT, J.E.; DOUGLAS, W.H.J. & FANBURG, B.L. Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells. J. Clin. Invest., New York, 68:995- -1002, 1981.
69. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. Statistical Methods, Iowa, The Iowa State University Press, 7th edition, 1980.
70. SOLONI, F.G. Simplified manual micromethod for determination of serum triglycerides. Clin. Chem., Winstom-Salem, 17:529- - 33, 1971.

71. SPARKS, C.E. & MARSCH, J.B. Metabolic heterogeneity of apolipoprotein B in the rat. J. Lipid Res., Bethesda, 22:519 - 527 , 1981.
72. TAN, M.H.; SATA, T. & HAVEL, R.J. The significance of lipoprotein lipase in rat skeletal muscles. J. Lipid Res., Bethesda, 18:363-70 , 1977.
73. TURLEY, 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., Bethesda, 22:551-69 , 1981.
74. WINDLER, E.; CHAO, Y.S. & HAVEL, R.J. Regulation of the hepatic uptake of triglyceride-rich lipoprotein in the rat. Opposing effects of homologous apolipoprotein E and individual C apoproteins. J. Biol. Chem., Baltimore, 255:8303-07, 1980.
75. WU, A.L. & WINDMUELLER, H.G. Variant forms of plasma apolipoprotein B: hepatic and intestinal biosynthesis and heterogeneous metabolism in the rat. J. Biol. Chem., Baltimore, 256:3615-18, 1981.
76. ZILVERSMIT , D.B. Formation and transport of chylomicrons . Fed. Proc., Washington, 26(6):1599- 605, 1967.
77. ZILVERSMIT, D.B. Atherogenesis: A postprandial phenomenon. Circulation, New York, 60:473-85 , 1979.
78. ZILVERSMIT, D.B. & DAVIS, A.K. Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic acid precipitation. J. Lab. Clin. Med., St. Louis, 31:155-60, 1950.

79. ZLTKIS, A. & ZAK, B. Study of a new cholesterol reagent .

Anal. Biochem., New York, 29:143-48, 1969.

RESUMO

Emulsões artificiais sem proteína simulando quilomícrons e remanescentes de quilomícron foram preparadas por sonificação de trioleína, lecitina, colesteril oleato e colesterol em solução aquosa. A seguir foram ultracentrifugadas em gradiente descontínuo de densidade. As emulsões, marcadas com ^3H -trioleína e ^{14}C -colesteril oleato foram injetadas via intra-arterial em ratos controle e em ratos tratados com Triton WR1339, sulfato de protamina e heparina, medindo-se a seguir a remoção plasmática do colesteril-ester e dos triglicérides, durante dez minutos.

O Triton WR 1339 e a protamina inibiram a lipólise dos quilomícrons artificiais, diminuindo a remoção destas partículas do plasma. O Triton WR 1339 mostrou ser mais efetivo que a protamina nestes efeitos. Por outro lado, a heparina promoveu uma lipólise rápida e brusca nos quilomícrons artificiais, assim como uma aceleração na remoção destas partículas do plasma.

Em contraste flagrante com esses resultados, o metabolismo dos remanescentes de quilomícron não foi consideravelmente afetado pelo tratamento com Triton e heparina.

Estas experiências indicam que as emulsões artificiais reproduzem o comportamento metabólico dos quilomícrons e remanescentes de quilomícron naturais, em condições em que a atividade da lipase lipoproteica esteja alterada.

SUMMARY

Protein-free emulsions models of chylomicrons and chylomicron remnants were prepared by sonicating triolein, lecithin, cholesteryl oleate and cholesterol in aqueous saline media, followed by ultracentrifugation in density gradient solution. The ^3H -triolein and ^{14}C -cholesteryl oleate labeled emulsions were injected into the carotid artery of control rats and rats treated with Triton WR 1339, protamine sulphate and heparin. Plasma removal of both labels was measured during ten minutes in two minutes intervals.

Triton WR 1339 and protamine sulphate strongly inhibited lipolysis of chylomicron-like emulsions leading to delayed removal of the particles from blood. Triton WR 1339 appeared to be more effective than protamine to elicit these effects. On the other hand, heparin produced instantaneous lipolysis of the chylomicron-like particles markedly enhancing its removal from plasma.

Contrarily, chylomicron remnant-like emulsions were not considerably affected either by Triton WR 1339 or by heparin treatment. The above described results obtained with artificial emulsions support current concepts on the metabolic behavior of natural chylomicron and remnant submitted to changes in lipoprotein lipase action.

APÊNDICE

APÊNDICE 1: VALORES INDIVIDUAIS COM OS RESPECTIVOS ERROS PADRÃO DA MÉDIA DO PESO E DA REMOÇÃO PLASMÁTICA DO COLESTERIL-(1-¹⁴C)OLEATO E GLICERILTRI [9,10(N)-³H] OLEATO DE QUILOMÍCRONS ARTIFICIAIS INJETADOS EM RATOS CONTROLE

Rato	Peso (g)	TFR _{TG} (min ⁻¹)	TFR _{CE} (min ⁻¹)	Índice de Lipólise
1	276	0,19	0,13	0,06
2	306	0,15	0,07	0,08
3	272	0,12	—	—
4	310	0,19	0,11	0,08
5	281	0,18	0,09	0,09
6	229	0,25	0,12	0,13
7	247	0,26	0,10	0,16
8	241	0,24	0,14	0,10
9	273	0,17	0,12	0,05
Média	270,6	0,19	0,11	0,09
Erro Padrão da Média	9,23	0,02	0,01	0,01

TFC_{TG} - Taxa fracional de remoção dos triglicérides

TFC_{CE} - Taxa fracional de remoção do Colesteril oleato

APÊNDICE 2: VALORES INDIVIDUAIS COM OS RESPECTIVOS ERROS PADRÃO
DA MÉDIA DO PESO E DA REMOÇÃO PLASMÁTICA DO COLESTERIL-(1-¹⁴C)OLEATO E GLICERILTRI[9,10(N)-³H]OLEATO DE
QUILOMÍCRONS ARTIFICIAIS INJETADOS EM RATOS TRATADOS
COM SULFATO DE PROTAMINA

Rato	Peso (g)	TFR _{TG} (min ⁻¹)	TFR _{CE} (min ⁻¹)	Índice de Lipólise
1	251	0,11	0,06	0,05
2	234	0,10	0,04	0,06
3	343	0,07	0,03	0,04
4	257	0,11	0,05	0,06
5	251	0,12	0,07	0,05
Média	267	0,10	0,05	0,05
Erro Padrão da Média	19,30	0,01	0,01	0,004

TFC_{TG} - Taxa fracional de remoção dos triglicérides

TFC_{CE} - Taxa fracional de remoção do Colesteril oleato

APÊNDICE 3: VALORES INDIVIDUAIS COM OS RESPECTIVOS ERROS PADRÃO
DA MÉDIA DO PESO E DA REMOÇÃO PLASMÁTICA DO COLESTERIL-(1-¹⁴C)OLEATO E GLICERILTRI[9,10(N)-³H]OLEATO DE
QUILOMÍCRONS ARTIFICIAIS INJETADOS EM RATOS TRATADOS
COM TRITON WR 1339

Rato	Peso (g)	TFR _{TG} (min ⁻¹)	TFR _{CE} (min ⁻¹)	Índice de Lipólise
1	263	0,03	0,03	zero
2	264	0,03	0,02	0,01
3	262	0,02	—	—
4	255	0,02	0,03	-0,01
5	280	0,05	0,05	zero
6	258	0,03	0,03	zero
7	249	0,04	0,03	0,01
8	275	0,03	0,04	-0,01
9	278	0,04	0,04	zero
Média	265,6	0,03	0,03	zero
Erro Padrão da Média	3,27	0,003	0,003	0,003

TFC_{TG} - Taxa fracional de remoção do triglicérides

TFC_{CE} - Taxa fracional de remoção do Colesteril oleato

APÊNDICE 4: VALORES INDIVIDUAIS COM OS RESPECTIVOS ERROS PADRÃO
DA MÉDIA DO PESO E DA REMOÇÃO PLASMÁTICA DO COLESTERIL-(1-¹⁴C)OLEATO E GLICERILTRI [9,10(N)-³H] OLEATO
DE QUILOMÍCRONS ARTIFICIAIS INJETADOS EM RATOS TRATADOS COM HEPARINA

Rato	Peso (g)	TFR _{TG} (min ⁻¹)	TFR _{CE} (min ⁻¹)	Índice de Lipólise
1	262	—	0,24	—
2	290	—	0,25	—
3	334	—	0,14	—
4	287	—	0,28	—
5	233	—	0,22	—
6	314	—	0,26	—
7	299	—	0,24	—
8	265	—	0,19	—
9	272	—	0,38	—
10	283	—	0,30	—
Média	283,9		0,25	
Erro Padrão da Média	8,99		0,02	

TFC_{TG} - Taxa fracional de remoção dos triglicérides

TFC_{CE} - Taxa fracional de remoção do Colesteril oleato

APÊNDICE 5: VALORES INDIVIDUAIS COM OS RESPECTIVOS ERROS PADRÃO
DA MÉDIA DO PESO E DA REMOÇÃO PLASMÁTICA DO COLESTERIL-(1-¹⁴C)OLEATO E GLICERILTRI[9,10(N)-³H]OLEATO DE
REMANESCENTES DE QUILOMÍCRON ARTIFICIAIS INJETADOS
EM RATOS CONTROLE

Rato	Peso (g)	TFR _{TG} (min ⁻¹)	TFR _{CE} (min ⁻¹)	Índice de Lipólise
01	305	0,15	0,14	0,01
02	325	0,11	0,11	zero
03	260	0,14	0,12	0,02
04	277	0,27	0,23	0,04
05	261	0,26	0,24	0,02
06	249	0,30	0,25	0,05
07	293	0,21	0,16	0,05
08	290	0,18	0,24	-0,06
09	311	0,24	0,27	-0,03
10	245	0,16	0,17	0,01
11	280	0,22	—	—
12	278	0,37	0,37	zero
13	311	0,12	—	—
14	246	0,29	—	—
15	245	0,31	—	—
16	324	0,14	—	—
17	312	0,52	0,50	0,02
18	343	0,14	—	—
19	322	0,28	—	—
20	283	0,34	—	—
21	296	0,35	—	—
22	273	0,49	—	—
23	266	0,43	—	—
Média	286,7	0,26	0,23	0,01
Erro Padrão da Média	6,02	0,03	0,03	0,01

TFC_{TG} - Taxa fracional de remoção dos triglicérides

TFC_{CE} - Taxa fracional de remoção do Colesterol oleato

APÊNDICE 6: VALORES INDIVIDUAIS COM OS RESPECTIVOS ERROS PADRÃO
DA MÉDIA DO PESO E DA REMOÇÃO PLASMÁTICA DO COLESTERIL-(1-¹⁴C)OLEATO E GLICERILTRI[9,10(N)-³H] OLEATO
DE REMANESCENTES DE QUILOMÍCRON ARTIFICIAIS INJETADOS EM RATOS TRATADOS COM TRITON WR 1339

Rato	Peso (g)	TFR _{TG} (min ⁻¹)	TFR _{CE} (min ⁻¹)	Índice de Lipólise
1	245	0,32	0,29	0,03
2	260	0,26	0,24	0,02
3	273	0,27	0,28	-0,01
4	270	0,24	0,22	0,02
5	239	0,22	0,25	-0,03
6	240	0,13	0,13	zero
7	240	0,15	0,15	zero
8	355	0,23	—	—
9	337	0,15	—	—
10	300	0,22	—	—
11	269	0,25	—	—
12	257	0,27	—	—
13	264	0,30	—	—
Média	273,00	0,23	0,22	0,004
Erro Padrão da Média	10,18	0,02	0,02	0,01

TFR_{TG} - Taxa fracional de remoção dos triglicérides

TFR_{CE} - Taxa fracional de remoção do Colesteril oleato

APÊNDICE 7: VALORES INDIVIDUAIS COM OS RESPECTIVOS ERROS PADRÃO
DA MÉDIA DO PESO E DA REMOÇÃO PLASMÁTICA DO COLESTERIL-(1-¹⁴C)OLEATO E GLICERILTRI[9,10(N)-³H] OLEATO
DE REMANESCENTES DE QUILOMÍCRON ARTIFICIAIS INJETADOS EM RATOS TRATADOS COM HEPARINA

Rato	Peso (g)	TFR _{TG} (min ⁻¹)	TFR _{CE} (min ⁻¹)	Índice de Lipólise
1	256	0,27	0,18	0,09
2	241	0,26	0,20	0,06
3	263	0,43	0,27	0,16
4	255	0,49	0,37	0,12
5	270	0,31	0,26	0,05
6	321	0,23	0,21	0,02
7	322	0,28	0,23	0,05
Média	275,4	0,32	0,25	0,08
Erro Padrão da Média	13,34	0,04	0,02	0,02

TFR_{TG} - Taxa fracional de remoção dos triglicérides

TFR_{CE} - Taxa fracional de remoção do Colesterol oleato