UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

Avaliação de aspectos funcionais da lipoproteína de alta densidade (HDL) e suas subfrações em pacientes com doença arterial coronária.

Antonio Carlos de Arruda Leite Júnior

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR.

Orientador:Professor Titular Raul Cavalcante Maranhão.

SÃO PAULO

2015

Antonio Carlos de Arruda Leite Júnior

Avaliação de aspectos funcionais da lipoproteína de alta densidade (HDL) e suas subfrações em pacientes com doença arterial coronária.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Professor Titular Raul Cavalcante Maranhão
Orientador/presidente

_____
1° examinador

_____
2° examinador

_____
3° examinador

_____
4° examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2015.

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Antonio e Aparecida pelo amor, apoio e dedicação que recebi desde meu nascimento.

Aos meus avós, Lisino e Maria, pelo incentivo e auxílio em todos os momentos.

A minha irmã Francine pelas limitações que foram conseqüência de minha jornada.

A minha companheira Priscila, pela ajuda, compreensão e pelos momentos especiais que tenho a oportunidade de viver ao seu lado.

A minha querida filha Lívia, por toda alegria que trouxe a mim e minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Raul Cavalcante Maranhão, por ter me recebido em seu laboratório e pelos seus valiosos ensinamentos que contribuíram de maneira muito importante para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus alunos, Thiago Bella, Deborah Bispo e Juliana, pelo auxílio, pela dedicação aos estudos e pelos bons momentos que tivemos juntos.

A Michele Patricínio Rocha, pela amizade e pelas oportunidades de trabalho e aprendizado em conjunto.

A Fernanda Maniero, por ter me recebido com carinho e solidariedade em minha chegada ao Instituto do Coração.

A Amanda Felippe Padoveze e Tatiana Vanessa pelas oportunidades de trabalho e aprendizado.

A Tatiana Solano e Iara Kretzer, pela amizade e valiosa colaboração no desenvolvimento de meu doutorado.

Ao amigo Vanderlei, pelos valiosos conselhos, pela palavra fraterna e sincera que traz calma e admiração.

A professora Maria Rita Marques de Oliveira, ao professor Luiz Madaleno Franco e ao professor Sérgio Rochelle, pelo apoio e confiança.

A Carmen Vinagre e Juliana Vinagre e Fernand Pozzi, pelo apoio nas diversas etapas de minha jornada.

A todos os amigos do Laboratório de Metabolismo de Lípides, todos os funcionários, estagiários e pós-graduandos.

Resumo

Estudos clínicos e epidemiológicos indicam que baixas concentrações plasmáticas da lipoproteína de alta densidade (HDL) estão forte e independentemente associadas a uma maior incidência de doença arterial coronária (DAC). Entretanto, o insucesso dos agentes que são capazes de aumentar a concentração de HDL-C sugere que a funcionalidade da HDL pode representar um alvo terapêutico mais apropriado. Para a avaliação de um dos aspectos funcionais da HDL, o presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método de grande praticidade que permite uma visão integrada de uma etapa fundamental do metabolismo que é a transferência de lípides entre as diferentes classes de lipoproteínas. A avaliação deste fenômeno nas subfrações de HDL, aspecto ainda não explorado, poderá fornecer novas informações a respeito da fisiopatologia da DAC. O método descrito no presente trabalho permite a avaliação da transferência simultânea das quatro principais classes lipídicas doadas por uma nanoemulsão semelhante à LDL para a HDL3. Foi realizada análise dos possíveis interferentes neste método. Verificou-se que a elevação da temperatura de 0 a 40 °C resultou em aumento progressivo na transferência de todos os lipídeos para a HDL3. A variação de pH entre 6,5 e 8,5 e o aumento na concentração de albumina não alteraram os valores de transferência. O aumento no tempo de incubação acima de 60 minutos promoveu diminuição na transferência de colesterol esterificado para a HDL3 e aumento na transferência de fosfolipídeos. O método apresentou boa precisão intra e inter-ensaio, sendo o coeficiente de variação menor que 5% para todos os lipídeos. A porcentagem média de transferência de colesterol livre, fosfolipídeos, triacilglicerol e colesterol em 45 invíduos saudáveis foi de respectivamente de 1,1±0,06; 13,5±0,15; 2±0,05 e 0,84±0,04% e em 45 portadores de doença arterial coronária foi respectimente 1,0±0,04; 15,8±0,44; 1,77±0,04 e 1,0±0,06%. Não houve diferença nos valores de idade, IMC, colesterol total, HDL-C, LDL-C, triacilglicerol, apo A-1, apo B, CETP, PLTP e LCAT, mas os indivíduos portadores de doença arterial coronária apresentaram valores maiores de colesterol livre e colesterol total em relação aos indivíduos saudáveis. O método desenvolvido no presente estudo é prático, preciso e de potencial relevância como ferramenta no estudo dos distúrbios de função da HDL.

Abstract

Clinical and epidemiological studies show that low concentrations of high density lipoproteins (HDL) are strongly and independently associated to an increased incidence of coronary artery disease (CAD). However, the lack of success of some drugs developed to increase HDL cholesterol concentrations (HDL-C) suggests that the functional aspects of HDL may represent a more appropriate therapeutic target. To study one of the functional aspects of HDL, the present work describes the development of a practical method that provides an integrated view of a fundamental step of lipid metabolism, namely, the lipid transfer among different lipoprotein classes. This phenomenon in the HDL subfractions is yet unexplored, and could provide new insights on the pathophysiology of CAD. The method described here allows the measurement of the ability of HDL3 to receive the major lipid classes from a radioactively labeled nanoparticle that resemble LDL. The possible interfering factors at the lipid transfer to HDL3 were studied. The increase in the assay temperature from 0 to 40 °C results in a progressive increase in the net transfer of all lipids to HDL3. The increase in incubation time above 60 minutes resulted in a reduced transfer of cholesterol esters to HDL3 with a concomitant increase in the transfer of phospholipids to the latter. The method presented adequate intra and inter-assay precision, with a coefficient of variation smaller than 5% for all lipids. The average percentage of free cholesterol, phospholipids, triacilglycerol an cholesterol transfer to HDL3 was respectively of 1,1±0,06; 13,5±0,15; 2±0,05 e 0,84±0,04% in 45 healthy individuals and 1,0±0,04; 15,8±0,44; 1,77±0,04 e 1,0±0,06% in 45 CAD patients. There was no difference in the age, BMI, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, triacilglycerol, apo A-1, apo B, CETP, PLTP and LCAT but the CAD patients had higher levels of total cholesterol and free cholesterol. The method described here is practical, precise and potentially relevant as a tool to study HDL function.

1. INTRODUÇÃO 10

1.1. Lipoproteínas plasmáticas 10

1.1.1. Transporte e metabolismo das lipoproteínas 11

1.2. HDL e o transporte reverso do colesterol 13

1.3. Nanoemulsões lipídicas como instrumento em investigações fisiopatológicas 16

1.4. Fisiopatologia da aterosclerose 18

1.5. HDL como fator antiaterogênico 19

1.5.1. Capacidade antioxidante da HDL 21

1.5.2. Capacidade antiagregante plaquetária da HDL 22

2. OBJETIVOS 24

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS 25

3.1. Preparação da nanoemulsão lipídica 26

3.2. Transferência de colesterol, colesterol esterificado, triglicerídeos e fosfolipídeos da nanoemulsão para a HDL 26

3.3. Transferência de colesterol, colesterol esterificado, triglicerídeos e fosfolipídeos da nanoemulsão para a HDL3 27

3.4. Testes de validação 29

3.4.1. Variação de temperatura 29

3.4.2. Variação de pH 29

3.4.3. Tempo de incubação 30

3.4.4. Concentração de albumina 30

3.4.5. Concentração de HDL-C 30

3.4.6. Capacidade antioxidante da HDL 31

3.5. Capacidade antiagregante plaquetária da HDL 32

3.6. Análise estatística 32

4. RESULTADOS 33

4.1. Variação de temperatura 33

4.2. Variação de pH 34

4.3. Tempo de incubação 34

4.4. Concentração de albumina 35

4.5. Efeito da concentração de HDL-C 35

4.6. Validação intra- e inter-ensaio 36

4.7. Características clínicas e laboratoriais 36

4.8. Transferência de lipídeos 37

4.9. Capacidade antioxidante da HDL 39
4.10. Capacidade antiagregante plaquetária 42
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES 43
6. REFERÊNCIAS 49

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Efeito do aumento da temperatura sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95% (n=5 alíquotas para cada temperatura). 33

Figura 2: Efeito da variação do pH plasmático entre 6,5; 7,0; 7,4; 8,0; e 8,5 sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95% (n=5 alíquotas para cada pH). 34

Figura 3: Efeito da variação na concentração de albumina entre 3,5; 4,0; 4,5; 5,6; e 7,0 mg/dL sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95% (n=5 alíquotas para cada concentração). 35

Figura 4: Efeito da variação na concentração de HDL-C entre 33; 47; 84; 100; e 133; 185; e 244 mg/dL sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95% (n=5 alíquotas para cada concentração). * (p<0,001 vs 33 mg/dL). 36

Figura 5: Porcentagem de transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3 de pacientes portadores de doença arterial coronária (DAC, n=45) e indivíduos saudáveis (grupo controle, n=45) Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95%. * (p<0,001 vs controle, teste t de student)..... 38

Figura 6. Perfil típico da cinética de oxidação da LDL induzida por CuSO4 determinada pela mensuração da absorbância à 234 nm que aumenta em função da produção de dienos conjugados (Figura obtida do artigo de Ashton L. ET al 2000). 39

Figura 7. Aumento na absorbância em função do tempo (minutos) após incubação de diferentes concentrações de CuSO4 (5, 25 e 50 µM) com 50 mg/mL de LDL. 40

Figura 8. Variação no tempo (minutos) da fase de resistência à oxidação ("lag time") em função da concentração de LDL. 41

Figura 9. Cinética de oxidação da LDL obtida pela incubação de 200 mg/mL de LDL com 25 µM de CuSO4 (tempo em minutos)..... 41

Figura 10. Cinética de oxidação da LDL após incubação de 100 mg/mL de LDL e 25 µM de CuSO4 na presença e na ausência de HDL. 42

Figura 11: Avaliação da capacidade antioxidante da HDL (A e B) e da capacidade antiagregante plaquetaria da HDL (C e D) nos grupos controle e DAC. * p = 0.0069. C) p < 0.0001. D) p < 0.0001. 43

Tabela 1: Efeito do tempo de incubação (em minutos) sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores de porcentagem expressos em média ± desvio padrão (n=5 alíquotas para cada tempo de incubação). * (p<0,05 vs tempo 0, teste t de student) 35

Tabela 2 Características clínicas e bioquímicas dos portadores de doença arterial coronária (DAC) e dos indivíduos saudáveis (grupo controle). Idade em anos. IMC = índice de massa corporal. CT (mg/dL) = colesterol total. HDL-C (mg/dL) = colesterol de HDL. LDL-C (mg/dL) = colesterol de LDL. TG (mg/dL) = triacilglicerol. CL (mg/dL) = colesterol livre. Apo A-1 (mg/dL) = apolipopeína A-1. Apo B (mg/dL) = apolipoproteína B. CETP (atividade em pmol/µL/h) = proteína de transferência de ésteres de colesterol. PLTP (atividade em pmol/µL/h) = proteína de transferência de fofolipídeos. LCAT (unidades arbitrárias) = lecitina colesterol- aciltransferase. Valores expressos em média ± desvio padrão. * (p<0,05, teste t de student) vs controle..... 37

Tabela 3: Porcentagem de transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL e HDL3 de pacientes portadores de doença arterial coronária (DAC, n=45) e indivíduos saudáveis (grupo controle, n=45) e valores teóricos de porcentagem de transferência para a "HDL2". Valores expressos em média ± desvio padrão. * (p<0,001 vs controle)..... 38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lipoproteínas plasmáticas

Lipoproteínas são complexos macromoleculares pseudo-micelares que apresentam lipídeos e proteínas em sua composição e permitem o transporte de lipídeos pelos fluidos corporais. Estas partículas são compostas por um núcleo hidrofóbico que contém moléculas de triacilglicerol (TG) e colesterol em sua forma esterificada (CE), bem como uma superfície anfipática composta por fosfolipídeos (PL), colesterol (CL) e proteínas. Os lipídeos e proteínas presentes na composição das lipoproteínas plasmáticas apresentam-se em diferentes proporções, resultando em partículas que variam em tamanho e densidade (COHN *et al*., 1946; Berg, 1963; OLSON, 1998).

As lipoproteínas são classificadas principalmente de acordo com a densidade nas quais elas flotam após ultracentrifugação e deste modo são denominadas como quilomícron, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (ROSENFELD, 1989; BENOIT *et al*., 2011).

A parte proteica das lipoproteínas é denominada apolipoproteína, que atua na modulação do transporte e do metabolismo das lipoproteínas. Por exemplo, o aporte de lipídeos a determinadas células requer o reconhecimento de apolipoproteínas específicas por receptores presentes na superfície destas células. As apolipoproteínas são importantes para manter a estabilidade estrutural das lipoproteínas, aumentam a solubilidade das lipoproteínas em meio aquoso devido à suas características anfipáticas e, além disso, atuam como ativadores ou inibidores de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico. A nomenclatura das apolipoproteínas é alfanumérica, sendo que as apolipoproteínas A (apoA) e as

apolipoproteínas B (apoB) são as apolipoproteínas em maior abundância nas principais classes de lipoproteínas (SHAEFER *et al.,* 1978).

Durante sua presença nos fluídos corporais, as lipoproteínas passam por intenso processo de remodelamento, onde parte de seu conteúdo lipídico e proteico pode ser transferida entre as diferentes classes de lipoproteínas e também entre os tecidos. Disfunções nos processos de transferência de lipídeos entre diferentes classes de lipoproteínas podem estar relacionadas a doenças como a obesidade, hipotireoidismo, diabetes *mellitus*, doença arterial coronária (DAC), entre outras. (LO PRETE *et al*., 2009; PUK *et al*., 2009; CASELLA-FILHO *et al*., 2011; VINAGRE., 2011; da SILVA *et al*., 2011 1; SIGAL *et al*., 2011). Deste modo, é importante o entendimento dos processos de remodelamento das lipoproteínas, conforme descrito nos itens a seguir.

1.1.1. Transporte e metabolismo das lipoproteínas

A digestão dos lipídeos tem início no estômago, principalmente pela ação da lípase gástrica, que promove a hidrólise, preferencialmente de TG, resultando na liberação de ácidos graxos de cadeia curta e média. A lípase pancreática, liberada no duodeno, hidrolisa ácidos graxos de cadeia longa, finalizando o processo de digestão das moléculas de TG. Além disso, ocorre também no duodeno o processo de emulsificação dos lipídeos pelos ácidos biliares e concomitantemente, a hidrólise dos ésteres de colesterol e fosfolipídeos pela colesterol esterase e fosfolipase A2, respectivamente. Os compostos resultantes do processo de digestão lipídica (colesterol, ácidos graxos, lisofosfolipídeos e monoglicerídeos) formam micelas devido às interações com os sais biliares e a absorção destas moléculas é realizada na borda em escova por meio de difusão passiva, ou

facilitada por transportadores como a proteína NPC1L1 (proteína semelhante à Nieman-Pick 1 C1) (BAGINSKI *et al*.; 1977; LOWE, 2007;).

No compartimento intracelular dos enterócitos, os monoglicerídeos são re-esterificados para formar novas moléculas de TG e o colesteol é esterificado pela acil colesterol aciltransferase (ACAT). Estes lipídeos serão utilizados para compor o núcleo das primeiras lipoproteínas formadas após a absorção de lipídeos da dieta, denominadas quilomícrons. No retículo endoplasmático rugoso, os quilomícrons em processo de formação, denominados pré-quilomícrons, incorporam a apolipoproteína B-48 (apo B-48), apolipoproteína A-I (apo A-I), apolipoproteína A-II (apo A-II) e a apolipoproteína A-IV (apo A-IV). Posteriormente, os quilomícrons são secretados no ducto torácico e atingem em seguida a circulação periférica, onde adquirem a apolipoproteína CII e a apolipoproteína E da HDL, além de transferir para esta lipoproteína apo A-I, apo A-IV e fosfolipídeos (PENACCHIO *et al*., 2001; DUCHATEAU *et al*., 1997). A apoC-II é um cofator da lipoproteína lípase, uma enzima localizada na superfície endotelial, que facilita a hidrólise de TGs destas lipoproteínas. Os ácidos graxos liberados após a hidrólise dos TGs são captados pelas células musculares para utilização como fonte de energia, ou re-esterificados em TG no tecido adiposo. O resultado deste processo de hidrólise é a formação de partículas de menor tamanho, denominadas quilomícrons remanescentes, que são rapidamente captados pelo fígado por endocitose mediada pelos receptores LRP (proteína semelhante ao receptor de LDL) ou pelo LDLR (receptor de LDL) presentes na superfície das células parenquimais (REDGRAVE *et al*., 1985; LEVY, 1991).

No fígado, a apolipoproteína B-100 (apo B-100) é expressa constitutivamente e utilizada na síntese de VLDL. A proteína de transferência microssomal (MTP) promove a incorporação de moléculas de TG nas partículas

nascentes de VLDL e a proteína de transferência de fosfolipídeos (PLTP) adiciona fosfolipídeos para a formação da superfície desta lipoproteína (HUSSAIN *et al*., 2013; TALL *et al*., 1983). As partículas de VLDL, que são ricas em TG, são secretadas na circulação periférica e hidrolisadas pela LPL de modo semelhante aos quilomícrons e produzindo remanescentes de VLDL, sendo o de menor tamanho denominado de IDL. Em comparação à VLDL, as partículas de IDL são relativamente enriquecidas CE e apresentam menor quantidade de TG. Algumas partículas de IDL são captadas diretamente pela interação da apo-E com o LDLR no fígado, enquanto outras são hidrolisadas pela lípase hepática para produzir a LDL, que corresponde ao produto final do catabolismo da VLDL (REDGRAVE *et al*., 1985). Moléculas de TG podem ser transferidas da VLDL e IDL para a HDL e LDL, que doam em troca ésteres de colesterol. Este processo de transferência de lipídeos entre as classes de lipoproteínas supracitadas é mediado pela proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) (MARCEL *et al*., 1980).

A LDL é uma lipoproteína rica em colesterol que apresenta em sua superfície uma molécula de apo B-100, que permite a captação destas partículas pelo LDLR e pelo LRP. O LDLR está presente em todas as células nucleadas, permitindo a captação de colesterol que será utilizado em alguns processos celulares, como a síntese de hormônios e membranas celulares (BROWN *et al*., 1981).

1.2. HDL e o transporte reverso do colesterol

A HDL representa uma fração heterogênea de partículas que variam em tamanho, forma, densidade, composição e carga de superfície. São as menores e mais densas entre todas as lipoproteínas. A HDL pode ser separada em duas principais subfrações com base em sua densidade. A subfração HDL2 é composta

por partículas de menor densidade (entre 1.063 e 1.125 g/ml), maior tamanho e maior conteúdo lipídico em relação à subfração HDL3, que é composta por partículas menores, mais densas (entre 1.125–1.21 g/ml) e de maior conteúdo proteico (ROSENSON, 2011; KONTUSH *et al*., 2010). Após separação inicial por ultracentrifugação, a HDL pode ser subfracionada por eletroforese em cinco subfrações que são obtidas pela diferença de tamanho e carga entre as diferentes partículas. Assim, é possível obter subfrações que em ordem decrescente de tamanho, são denominadas de HDL2b (diâmetro médio de 10,6 nm), HDL2a (9,2 nm), HDL 3a (8,4 nm), HDL 3b (8,0 nm) e HDL 3c (7,6 nm). Outros métodos de separação como a ressonância magnética nuclear e a eletroforese bidimensional têm sido utilizados para identificação de subfrações da HDL. Métodos baseados na interação de lipoproteínas com poliânions macromoleculares como heparina e sulfato de dextrana também podem ser utilizados para obtenção das frações HDL2 e HDL3 (CALMONT *et al*., 2011; HIRANO *et al*.; 2008; ROSENSON, 2011; KONTUSH *et al*., 2010).

O transporte reverso do colesterol tem sido considerado como a principal função da HDL. Com exceção do fígado, as células periféricas obtém o colesterol pela combinação de síntese local e captação de colesterol transportado pelas lipoproteínas LDL e VLDL, que, conforme explicado anteriormente, tiveram origem no fígado. O transporte reverso do colesterol consiste no movimento oposto do colesterol, que é transferido das células periféricas para o fígado através do compartimento plasmático Este colesterol pode ser então utilizado para atender as demandas metabólicas, ou ser excretado nas fezes através da bile (MINEO *et al*., 2012). O transporte reverso do colesterol apresenta um papel fundamental na formação, maturação e degradação da HDL e envolve uma intensa transferência de lipídeos entre tecidos e diferentes classes de lipoproteínas. As partículas de

HDL podem ser produzidas a partir de moléculas de apo A-1 pobres em lipídeos secretadas pelo intestino e pelo fígado, ou liberadas pelo processo de lipólise dos quilomícrons e da VLDL, bem como por colisões entre estas lipoproteínas. Independentemente da origem, as partículas de apo A-1 pobres em lipídeos adquirem colesterol e PL de membranas celulares por de efluxo mediado por receptores, ou por difusão aquosa. Os processos supracitados resultam na formação de partículas de HDL de formato discoide, denominadas de pré-beta HDL, devido à sua característica de migração eletroforética. A proteína ABCA-1 (*ATP binding cassete transporter)* é uma importante proteína de membrana que facilita o efluxo celular de colesterol dos tecidos periféricos para as partículas de HDL nascente. O colesterol presente nas partículas de HDL nascente é esterificado pela lecitina colesterol acil-transferase (LCAT), resultando na formação de partículas de formato esférico, à medida que o colesterol é captado dos tecidos periféricos e esterificado. Assim, surge a HDL3, que apresenta formato esférico e continua recebendo lipídeos com consequente aumento de tamanho. A HDL2 surge como resultado do aumento no tamanho das partículas de HDL3, devido à maior acomodação de CE no núcleo hidrofóbico da partícula. A HDL recebe fosfolipídeos das lipoproteínas ricas em TG por meio da PLTP, e conforme citado anteriormente, recebe TG pela ação da CETP. As moléculas de TG recebidas pela HDL podem então ser catabolizadas pela lípase hepática (LH). Receptores "*scavenger*" B1 (SRB-1) no fígado promovem o catabolismo da HDL, por meio da captação de lipídeos, principalmente colesterol e CE. Assim, as trocas de lípides que ocorrem entre células e as diferentes classes de lipoproteínas plasmáticas são essenciais não apenas para a formação e maturação das partículas de HDL, mas também para a remoção de excesso de colesterol dos tecidos por meio do

transporte reverso do colesterol (MINEO *et al*., 2012; CALMONT *et al*., 2011 TALL *et al*., 1983 KONTUSH *et al*., 2010).

1.3. Nanoemulsões lipídicas como instrumento em investigações fisiopatológicas

Maranhão *et al* (1986) desenvolveram um sistema coloidal nanoparticulado que recebeu a denominação de LDE, cuja composição lipídica é semelhante à LDL. A LDE é produzida sem proteínas, mas adquire apo E após ser injetada na circulação sanguínea (MARANHÃO *et al*., 1986). Em indivíduos portadores de hipercolesterolemia, condição onde há deficiência de LDLR, verificou-se que a LDE era removida mais lentamente no grupo de indivíduos hipercolesterolêmicos, em relação aos indivíduos normocolesterolêmicos (MARANHÃO *et al*., 1997) e de utilizar a LDE como um instrumento na investigação de disfunções no metabolismo lipídico.

Estudos realizados em ratos demonstraram que a LDE apresenta cinética plasmática semelhante à LDL natural, sugerindo que a mesma é captada pelos receptores de LDL (MARANHÃO *et al*.; 1993). De fato, estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDE compete com a LDL natural pela captação celular (MARANHÃO *et al*.; 1997). Além disso, a LDE foi utilizada como veículo de fármacos para tecidos onde ocorre superexpressão do LDLR, como em tecidos neoplásicos, demonstrando a capacidade de se concentrar nesses tecidos (MARANHÃO *et al*.; 1994).

Recentemente, a LDE foi utilizada como instrumento para avaliação da capacidade da HDL em receber simultaneamente os principais constituintes lipídicos (CL, CE, PL e TG) das demais lipoproteínas plasmáticas (LO PRETE *et al*.; 2009). O método consiste na incubação do plasma total com a LDE, que atua

como doadora destas quatro classes lipídicas, que se apresentam marcadas radioativamente. Após precipitação química das lipoproteínas que contém apo B e da LDE, a porcentagem de lipídeos transferida para a HDL é determinada por meio de contagem de radioatividade no sobrenadante. O método foi utilizado no estudo de diferentes doenças relacionadas ao metabolismo da HDL (LO PRETE *et al*., 2009; PUK *et al*., 2009; CASELLA-FILHO *et al*., 2011; VINAGRE., 2011; da SILVA *et al*., 2011 1; SIGAL *et al*., 2011).

1.4. Fisiopatologia da aterosclerose

A aterosclerose é caracterizada pelo espessamento da parede arterial, particularmente em vasos de grande calibre. O espessamento é resultado da formação de uma estrutura denominada placa aterosclerótica, que resulta na redução no lúmen arterial. Placas ateroscleróticas avançadas podem eventualmente sofrer um processo de ruptura na camada endotelial, que expõe o conteúdo interno da placa aos componentes do sangue, resultando em agregação plaquetária no local da lesão. O trombo formado neste local pode causar uma oclusão total da luz do vaso, com consequente isquemia nos tecidos perfundidos pelos vasos acometidos. Além disso, o trombo pode se deslocar pela corrente sanguínea, podendo resultar principalmente em acidente vascular cerebral, embolia pulmonar ou a isquemia de membros inferiores (ROSS, 1999; LIBBY, RIDKER E MASERI, 2002).

A formação das placas ateroscleróticas é caracterizada por um acúmulo de lípides, de células inflamatórias e imunes derivadas do sangue periférico, principalmente monócitos e células T. O centro da placa aterosclerótica contém células espumosas, componentes residuais de células mortas e gotículas de lípides, incluindo colesterol esterificado e cristais de colesterol. Esta região central é envolvida por uma capa fibrosa contendo células musculares lisas e uma matriz rica em fibras de colágeno que estabilizam a placa. Células imunes como macrófagos, células T estão frequentemente em um estado de ativação inflamatória, produzindo citocinas, proteases, moléculas pró-trombóticas e substâncias vasoativas que podem afetar a função vascular (JONASSON *et al.*, 1986). Outras células presentes nas placas ateroscleróticas incluem células dentríticas, mastócitos, célula B e células T “natural killers” (BOBRYSHEV E LORD, 1995; KOVANEN, KAARTINEN E PAAVONEN, 1994).

Alterações no endotélio vascular que geralmente se iniciam devido a fatores de risco como hipercolesterolemia, hipertensão arterial, diabetes *mellitus* e tabagismo, resultam em maior permeabilidade vascular, facilitando a penetração de lipoproteínas no espaço subendotelial, particularmente as LDL pequenas e densas. Quando retidas na camada íntima das artérias, devido a sua ligação a proteoglicanos, estas lipoproteínas sofrem oxidação e as partículas oxidadas estimulam a produção de citocinas e moléculas de adesão em células endoteliais. Deste modo, ocorre recrutamento de leucócitos para a camada íntima, principalmente monócitos, que se diferenciam em macrófagos e captam de maneira intensa as partículas de LDL oxidada, formando células espumosas. Sob o estímulo deste meio pró-inflamatório, células musculares lisas migram da camada média para a camada íntima arterial e entram em processo de proliferação celular. Adicionalmente, estas células podem acumular lípides, particularmente ésteres de colesterol, formando também células espumosas. A progressão destes eventos de proliferação celular e de acúmulo de lípides resulta no espessamento da parede dos vasos (ROSS, 1999; LIBBY, RIDKER E MASERI, 2002).

1.5. HDL como fator antiaterogênico

A doença arterial coronária (DAC) é o resultado da formação de placas ateroscleróticas nas artérias coronárias e constitui a principal causa de mortalidade em todo o mundo. Estudos clínicos e epidemiológicos indicam que baixas concentrações plasmáticas da lipoproteína de alta densidade (HDL) estão forte e independentemente associadas a uma maior incidência da DAC (CASTELLI., 1986; GORDON., 1989).

Alguns fármacos desenvolvidos recentemente com o objetivo de aumentar as concentrações de HDL-C têm apresentado resultados desapontadores. Por

exemplo, Niseen *et al*. demonstraram no estudo ILLUSTRATE que a inibição da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP) pelo torcetrapib resultou em um aumento de 61% nas concentrações de HDL-C, mas não houve redução na progressão da aterosclerose coronária (GORDON., 1989; NISSEN., 2007; CASTELLI., 1986).

O insucesso dos agentes que são capazes de aumentar substancialmente a concentração de HDL-C sugere que a funcionalidade da HDL pode representar um alvo terapêutico mais apropriado em relação ao simples aumento de sua concentração (INDER., 2007).

Dentre os aspectos funcionais da HDL conhecidos atualmente, sua capacidade antioxidante, antiinflamatória, antiagregante plaquetária e a promoção do transporte reverso do colesterol têm sido considerados como os principais mecanismos pelos quais a HDL promove proteção contra o desenvolvimento da DAC. Tal heterogeneidade de funções biológicas, que não pode ser inferida pela simples mensuração dos níveis plasmáticos de HDL, levou a um grande interesse por metodologias voltadas à funcionalidade destas partículas com o objetivo de aprimorar a avaliação do risco cardiovascular e facilitar o estudo da eficácia de novos fármacos. De modo semelhante, existe grande interesse clínico em determinar se subfrações específicas da HDL podem ser mais informativas na avaliação de uma terapia dirigida a estas partículas (ROSENSON., 2011).

Entretanto, a HDL corresponde a uma fração heterogênea de partículas e pouco se conhece a respeito das propriedades antiaterogênicas das diferentes subfrações desta classe de lipoproteínas, principalmente por dificuldades em relação às metodologias para obtenção destas subfrações.

As trocas de lípides que ocorrem entre as diferentes classes de lipoproteínas plasmáticas são essenciais para a promoção do transporte reverso do colesterol.

Em nosso laboratório, desenvolvemos recentemente um método que permite avaliar a capacidade da HDL em receber simultaneamente os quatro componentes lipídicos das demais lipoproteínas. Este ensaio foi utilizado na investigação do metabolismo da HDL em diversas situações (LO PRETE., 2009; PUK., 2009; CASELLA-FILHO., 2011; VINAGRE., 2011; da SILVA., 2011; SIGAL.; 2011). Em um destes estudos, verificou-se que a capacidade da HDL em receber lípides não apresentou alterações significativas em 27 indivíduos com DAC comparados com 25 indivíduos sem DAC (LO PRETE., 2009). Entretanto, o tratamento com estatinas diminuiu a transferência de todos os lipídeos. Apesar destas observações iniciais, seria interessante estudar a capacidade das subfrações de HDL em receber lípides, principalmente a subfração HDL3, pois algumas evidências sugerem que esta subfração apresenta melhores propriedades antiaterogênicas em relação à HDL2 (KONTUSH., 2010).

Portanto, os diversos aspectos funcionais da HDL precisam de mais estudos, principalmente em relação ao papel das subfrações desta lipoproteína. Além disso, métodos mais práticos e adequados para a utilização em laboratórios clínicos precisam ser desenvolvidos.

1.5.1. Capacidade antioxidante da HDL

De acordo com a hipótese de resposta à retenção, lipoproteínas ricas em colesterol como a LDL são retidas na parede arterial, onde ficam susceptíveis a processos oxidativos induzidos pela ação de moléculas produzidas no microambiente subendotelial, tais como mieloperoxidases, óxido nítrico sintase e lipooxigenases (WILLIAMS., 1995.). Estas moléculas induzem a formação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e cloro. A presença destas espécies reativas pode promover o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos, que também

auxiliam na propagação do processo oxidativo. Estudos in vitro e in vivo demonstraram que a HDL é capaz de proteger a LDL contra a oxidação induzida pelas espécies reativas supracitadas (KONTUSH., 2010).

Os hidroperóxidos lipídicos presentes na LDL podem ser transferidos da LDL para a HDL. De fato, Zerrad-Saadi et al, demonstraram que hidroperóxidos de fosfolipídeos são rapidamente transferidos da LDL para a HDL após a sua co-incubação. Tal transferência pode ocorrer diretamente entre as monocamadas de ambas as lipoproteínas, mas também pode ocorrer como resultado da ação de proteínas de transferência como a CETP. Deste modo, a transferência de hidroperóxidos lipídicos da LDL para a HDL induzida pela CETP pode atuar como um fator que intensifica o efeito antioxidante da HDL (ZERRAD-SAADI et al., 2009).

A susceptibilidade da LDL à oxidação pode ser mensurada por meio de métodos in vitro, onde é realizada a coincubação da LDL com agentes oxidantes como o sulfato de cobre ou o AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto). A oxidação da LDL induzida por estes agentes oxidantes resulta na formação de dienos conjugados, que podem ser mensurados por espectrofotometria, em comprimentos de onda entre 234 e 260 nanômetros. Assim, a capacidade antioxidante da HDL pode ser facilmente mensurada ao realizar a coincubação da LDL na presença de HDL e de um agente oxidante (ESTERBAUER., 1991).

1.5.2. Capacidade antiagregante plaquetária da HDL

Plaquetas são células sanguíneas anucleadas originadas do citoplasma de megacarióticos na medula óssea. Em condições fisiológicas, as plaquetas mantém a integridade do sistema vascular, pois são capazes de discriminar entre o endotélio lesado e o endotélio livre de lesões, impedindo processos de hemorragia pós-trauma (RUGERRI ., 2002). Entretanto, no contexto da doença aterosclerótica,

a atuação das plaquetas pode resultar em oclusão de vasos sanguíneos devido à formação de um trombo. Deste modo, a inibição da agregação plaquetária pode ser benéfica para pacientes que apresentam placas ateroscleróticas avançadas. Há evidências na literatura que sugerem uma possível relação inversa entre as concentrações de HDL-C e a agregabilidade plaquetária. Por exemplo, no estudo de Framinghan, verificou-se que em 3799 pacientes houve uma relação inversa entre a agregação plaquetária induzida por colágeno e a concentração de HDL-C destes pacientes (O'DONNELL., 2001). Um resultado semelhante ao supracitado foi obtido, no estudo realizado por Kameda et al, onde foi realizada análise de uma população japonesa de 937 indivíduos, sendo que os resultados sugeriram que a HDL apresentaria atividade antiagregante plaquetária (KAMEDA., 2011). Por outro lado, existem poucos estudos sobre as interações entre as plaquetas e a HDL e além disso, os poucos resultados relatados têm sido conflitantes (NOFER., 2010). Por exemplo, há evidências de que a adição de HDL ao plasma rico em plaquetas, que não resulta em alteração na agregação plaquetária induzida por ADP (DESAI ., 1989). Adicionalmente, outros estudos relatam que a adição de HDL pode até resultar em aumento na agregação plaquetária (HASSALL., 1983 ; NORDOY., 1979). Deste modo, devido à grande controvérsia da literatura, novos estudos são necessários para esclarecer o verdadeiro papel da HDL em relação à agregação plaquetária.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo a padronização de um método que permita a avaliação da capacidade da HDL3 e da HDL2 em receber lipídeos de uma nanopartícula semelhante à LDL.

Adicionalmente, pretende-se avaliar in vitro a capacidade da HDL e suas subfrações em receber lipídeos em pacientes com doença arterial coronária e indivíduos saudáveis e correlacionar os dados obtidos com outras avaliações bioquímicas.

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

Serão incluídos 45 portadores de DAC diagnosticada por cineangiocoronariografia e acompanhados ambulatorialmente no Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os dados destes pacientes serão pareados por idade e índice de massa corporal (IMC). Os critérios de exclusão serão: uso de medicamentos hipolipemiantes; tabagistas; doenças crônico-degenerativas; hipertensão arterial grave – Critério: pressão arterial > 180/110 mmHg, insuficiência renal (concentrações plasmáticas de creatinina, acima dos valores de referência); insuficiência hepática (atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina amino transferase (ALT), gama glutamil transferase (γGT) e fosfatase alcalina acima dos valores de referência); hipotireoidismo; história prévia de acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCH), hemorragias recentes, trombocitopenia, punção espinal recente, cirurgia recente e úlcera gástrica. Um grupo de 45 indivíduos saudáveis e sem alterações laboratoriais, pareados por idade e IMC será convidado para participar como grupo controle e serão avaliados com a mesma metodologia aqui exposta. Será solicitado consentimento livre e esclarecido por escrito a todos os participantes do estudo, após detalhada explicação feita pessoalmente pelo pesquisador responsável. O protocolo de pesquisa (número 0264/94) foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1. Preparação da nanoemulsão lipídica

A nanoemulsão será preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg *et al*. (1982) modificada por Maranhão *et al*. (1993). Foram pipetados em um frasco, 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol livre serão diluídos em clorofórmio:metanol (2:1) e a estes adicionados 70 kBq dos radioisótopos [3H]-colesterol esterificado e [14C]-fosfatidilcolina ou 70 kBq de [3H]-trioleína [14C]-colesterol. Os solventes residuais foram evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecação a vácuo, por 16h, a 4ºC. A emulsificação dos lipídeos foi realizada por irradiação ultrassônica (125W de potência) em 10 mL de solução tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0 durante 3 horas com temperatura entre 51 e 55°C. As nanopartículas foram purificadas por ultracentrifugação a 200.000 x g em duas etapas, a partir da flotação (densidade em 1,21g/mL por adição de KBr) da fração de partículas com tamanho e composição desejados e dialisadas contra solução tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0. Finalmente, a nanopartícula foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µM de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4ºC. Todo o material a ser utilizado passou por esterilização em autoclave a 120 ºC e despirogenizado em estufa a 180 ºC durante 90 minutos.

3.2. Transferência de colesterol, colesterol esterificado, triglicerídeos e fosfolipídeos da nanoemulsão para a HDL

As amostras dos pacientes foram coletadas após jejum de 12 horas, com EDTA (1,5 g/L) e o plasma será obtido após 10 minutos de centrifugação a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. Foram incubados 200 µL de plasma com 50 µL da nanoemulsão marcada radiativamente com [3H]-colesterol esterificado e [14C]-

fosfatidilcolina ou [14C]-trioleína e [3H]-colesterol por 60 minutos, a 37 ºC, em agitador orbital Gyromax 706R, sob agitação de 40 rpm. Após incubação, foram adicionados à mistura 250 µL de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2% / MgCl2, v/v). A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. A fração HDL será obtida após precipitação da nanoemulsão juntamente com as lipoproteínas contendo apo B. Alíquotas de 250 µL do sobrenadante, contendo a HDL foram pipetadas em frascos contendo 5 mL de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA) e, finalmente, a radioatividade presente nas amostras foi mensurada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA) com a utilização do software Plus Vers. 5.01 (Diamond Computers). O branco para este experimento consiste em mistura de 200 µL de solução tampão TRIS-HCL e 50 µL de nanoemulsão, incubada e precipitada nas mesmas condições descritas acima. O valor de radioatividade total presente na amostra foi determinado pela incubação de 200 µL de plasma com 50 µL de nanoemulsão, seguida de incubação, porém sem adição de reagente de precipitação. A quantificação dos lipídeos transferidos da nanoemulsão para a HDL plasmática será expressa como porcentagem (%) em relação à radioatividade total incubada (LO PRETE, 2007).

3.3. Transferência de colesterol, colesterol esterificado, triglicerídeos e fosfolipídeos da nanoemulsão para a HDL3

As amostras dos pacientes foi coletadas após jejum de 12 horas, com EDTA (1,5 g/L) e o plasma será obtido após 10 minutos de centrifugação a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. Foram incubados 200 µL de plasma com 50 µL da nanoemulsão marcada radiativamente com [3H]-colesterol esterificado e [14C]-

fosfatidilcolina ou [14C]-trioleína e [3H]-colesterol por 60 minutos, a 37 ºC, em agitador orbital Gyromax 706R, sob agitação de 40 rpm. Após incubação, Foram adicionados à mistura 250 µL do reagente de precipitação descrito por HIRANO *et al* 2008, que contém 1,071 U/ml de heparina, 500 mM/L de MnCl2 e 12 mg/mL de sulfato de dextran. A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm. A fração HDL3 foiobtida após precipitação da nanoemulsão juntamente com as lipoproteínas contendo apo B e a HDL2. Alíquotas de 250 µL do sobrenadante, contendo a HDL3 foram pipetadas em frascos contendo 5 mL de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA) e, finalmente, a radioatividade presente nas amostras foi mensurada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA) com a utilização do software Plus Vers. 5.01 (Diamond Computers). O branco para este experimento consiste em mistura de 200 µL de solução tampão TRIS-HCL e 50 µL de nanoemulsão, incubada e precipitada nas mesmas condições descritas acima. O valor de radioatividade total presente na amostra foi determinado pela incubação de 200 µL de plasma com 50 µL de nanoemulsão, seguida de incubação, porém sem adição de reagente de precipitação. A quantificação dos lipídeos transferidos da nanoemulsão para a HD3 plasmática foi expressa como porcentagem (%) em relação à radioatividade total incubada. Os valores de transferência para a HDL2 foram calculados pela diferença entre a porcentagem de lipídeos transferidos para a HDL e a porcentagem de lipídeos transferidos para a HDL3. Para padronização da metodologia, foi realizada análise de precisão inter-ensaio pela realização de 10 replicatas da mesma amostra e a precisão intra-ensaio será verificada pela realização de três ensaios de dez replicatas realizados em três dias diferentes. O limite máximo para estes parâmetros de validação será de 5%. Foi realizada análise do efeito de diferentes

condições de temperatura, pH, tempo de incubação e concentração de albumina sobre a transferência de lípides para a HDL3. Confirmou-se que o precipitante descrito por Hirano et. al. 2008 promove a precipitação da nanoemulsão lipídica, pois amostras contendo solução tampão TRIS-HCL e a nanoemulsão foram utilizadas como branco do experimento, e verificou-se que aproximadamente 99% da radiação permanece no precipitado.

3.4. Testes de validação

3.4.1. Variação de temperatura

O ensaio de transferência de lipídeos da LDE para a HDL3 foi realizado sob diferentes condições de temperatura. Neste teste, amostras de plasma foram incubadas de acordo com o método descrito no item 4.3, nas temperauras de 0, 4, 25, 37 e 40 °C. Para cada temperatura foram utilizadas 5 alíquotas da mesma amostra de plasma.

3.4.2. Variação de pH

Para avaliação do efeito do pH plasmático na transferência de lipídeo da LDE para HDL foi realizado ajuste do pH plasmático pela adição de solução de Tris-HCL para acidificar a amostra o Tris-NaOH para alcalinizar. Alíquotas de plasma nos pHs 6,5; 7,0; 8,0 e 8,5; foram incubadas e processadas conforme descrito no item 4.3. Para cada pH analisado foram utilizadas 5 alíquotas mesma amostra.

3.4.3. Tempo de incubação

Amostras de plasma foram incubadas com a LDE durante 0, 30, 60, 120, 18, 240, 300 e 360 minutos. Após este tempo de incubação, as amostras foram processadas conforme descrito no item 4.3. Os resultados de todas as temperaturas correspondem à média de 5 alíquotas da mesma amostra.

3.4.4. Concentração de albumina

Amostras de plasma com concentração de albumina de 3,5; 4,0; 4,55; 5,6 e 7,0 mg/dL foram testadas para avaliar o efeito da concentração de albumina na tranferência de lipídeo para a HDL. Tal variação foi obtida pela adição de concentrações crescentes de albumina bovina. O volume das diferentes amostras foi igualado pelo acréscimo de solução tampão TRIS-HCL (pH 7,4), por ser o mesmo tampão utilizado no preparo da nanoemulsão lipídica. O ensaio é relizado após retirar 200 µL destas soluções finais e o protocolo é seguido conforme descrito no item 4.3. O resultado corresponde à média de 5 alíquotas para cada concentração.

3.4.5. Concentração de HDL-C

O efeito da concentração de HDL-C na transferência de lipídeos para a HDL3 foi avaliado em amostras de contendo concentrações crescentes de HDL-C, que foi obtida por ultracentrifugação. A fração HDL foi adicionada ao plasma, resultando em concentrações de 33, 47, 84, 100, 133, 185 e 244 mg/dL, correspondendo a uma variação de 5 a 100% da concentração inicial da amostra. O volume das diferentes amostras foi igualado pelo acréscimo de solução tampão TRIS-HCL (pH

7,4). As amostras são processadas conforme descrito no item 4.3. O resultado corresponde à média de 5 alíquotas da mesma amostra de plasma.

3.4.6. Capacidade antioxidante da HDL

Para avaliar in vitro o efeito protetor da HDL contra a peroxidação lipídica da LDL, foi realizada a oxidação da LDL induzida por sulfato de cobre na presença da HDL. A LDL foi obtida sempre de um mesmo indivíduo normolipidêmico como controle de referência e isolada após ultracentrifugação por gradiente de densidade utilizando rotor 90Ti em ultracentrífuga Beckman a 70.000 RPM durante duas horas sob vácuo e a temperatura de 4 ^{o}C. Após a ultracentrifugação, a fração que corresponde à LDL foi removida e exaustivamente dialisada contra solução fisiológica contendo resina de troca iônica Chelex (Biorad) a 4 ^{o}C durante 24 horas na ausência de luminosidade. Após a diálise, as amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas a 4°C por no máximo 5 dias, protegidas da luminosidade. Para validar a utilização de amostras de HDL obtidas por precipitação química, foram testadas diferentes concentrações de LDL, HDL e de sulfato de cobre em microplacas de 96 poços transparentes à luz ultravioleta (Greiner Bio One). A concentração de proteínas das amostras de LDL e das frações de HDL foi determinada pelo método de Bradford, e após determinar as condições ideais do ensaio, 100 µg/mL de LDL foram incubados com 200 µg/mL de HDL na presença de 25 µM de sulfato de cobre. A formação de dienos conjugados em consequência da peroxidação lipídica foi monitorada por meio de leitura da absorbância à 234 nanômetros em leitor de microplacas durante 2 horas a 37 °C, sendo realizada uma leitura a cada 5 minutos. A leitura será realizada em leitor de microplacas sob as mesmas condições descritas acima.

3.5. Capacidade antiagregante plaquetária da HDL

Para análise da influência da HDL na agregação plaquetária, foi realizada a obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP), seguida de incubação com o ADP para a indução da agregação plaquetária. A agregação plaquetária foi mensurada pela mudança na absorbância ao longo do tempo em um leitor de microplacas. Para obtenção do PRP, foi realizada coleta de sangue em tubo contendo citrato como agente anticoagulante. As amostras foram centrifugadas à velocidade de 2000g durante 3 minutos a 4ºC. A HDL foi obtida após precipitação química, conforme descrito no item 4.3. Foram adicionados 100 µl de PRP em microplacas de 96 poços, e em seguida, 50 mg/mL de HDL. A microplaca foi incubada em leitor de microplaca PerkinElmer 2030 multilabel reader VICTOR ™ X3 durante 15 minutos a 37ºC. Posteriormente foi realizada a adição de 5 µl de ADP em cada poço, para a indução da agregação plaquetária. Foram realizadas leituras sucessivas a cada 9 segundos, após 9 segundos de agitação, que é realizada automaticamente pelo equipamento. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 405 nanômetros.

3.6. Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão ou média ± intervalo de confiaça de 95%. As análises de comparações entre os dois grupos serão realizadas utilizando o t-test, pois os dados se apresentaram de forma Gausseana. Os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes quando apresentou-se menor que 0,05 para um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

4.1. Variação de temperatura

Conforme mostra a figura 1, a elevação da temperatura de 0 a 40 °C resultou em aumento progressivo na transferência de todos os lipídeos para a HDL3, sendo que este aumento é mais evidente no intervalo entre 0 e 37 °C, a partir da qual um *plateau* é alcançado.

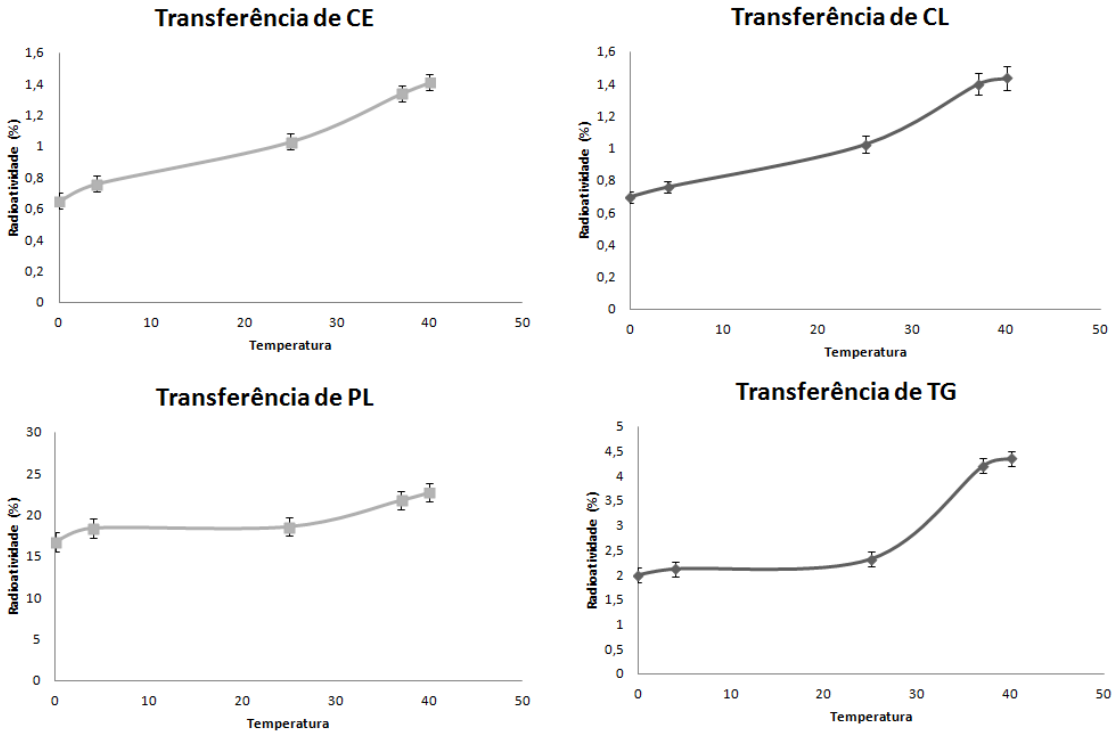

Figura 1: Efeito do aumento da temperatura sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95% (n=5 alíquotas para cada temperatura).

4.2. Variação de pH

O aumento do pH plasmático não afetou a transferência dos quatro lipídeos da LDE para a HDL3 conforme mostrado abaixo na figura 2.

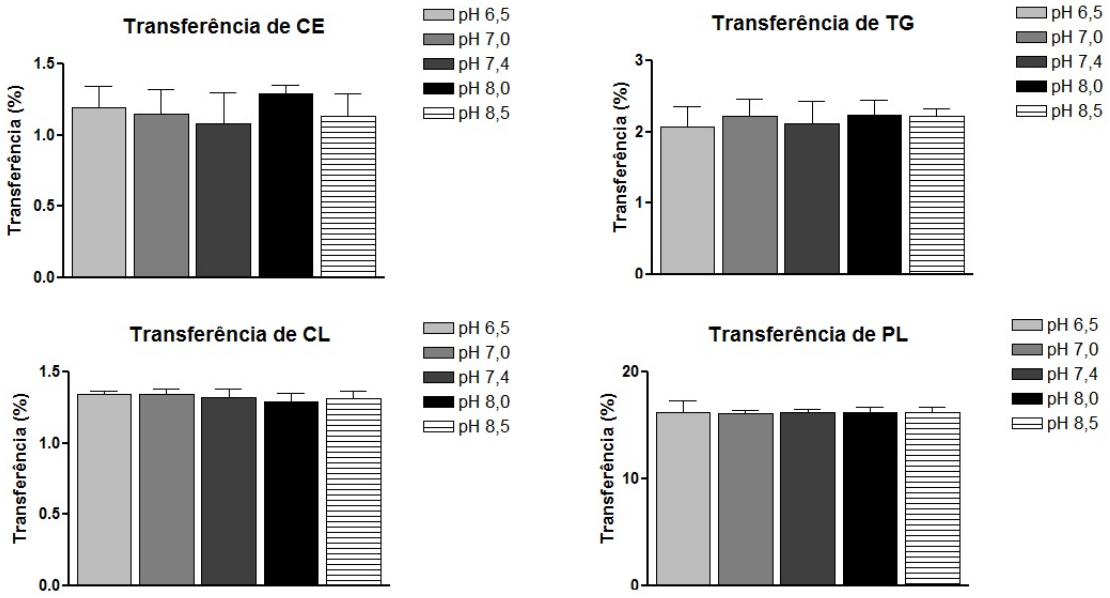

Figura 2: Efeito da variação do pH plasmático entre 6,5; 7,0; 7,4; 8,0; e 8,5 sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95% (n=5 alíquotas para cada pH).

4.3. Tempo de incubação

O aumento no tempo de incubação entre 0 e 120 minutos resulta em redução progressiva na transferência de colesterol e CE para a HDL3, com consequente aumento de transferência para a HDL2. A transferência de fosfolipídeos aumenta progressivamente, enquanto que a os valores de TG e CL não apresentaram alteração, conforme mostra a tabela 1.

Tempo	^{3}H CE	^{14}C PL	^{3}H TG	^{14}C CL
0	0,94 ± 0,01	15,8±0,1	4,76±0,2	2,2±0,05
5	0,95±0,01	16,1±0,1	4,61±0,3	2,04±0,02
30	0,89±0,01	16,7±0,1	5,1±0,2	1,97±0,01
60	0,88±0,05	17,5±0,1	5,0±0,02	1,96±0,01
90	0,79±0,01	19,1±0,3	4,7±0,01	2,15±0,01
120	0,74±0,02*	23,4±0,2*	4,8±0,1	1,99±0,01

Tabela 1: Efeito do tempo de incubação (em minutos) sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores de porcentagem expressos em média ± desvio padrão (n=5 alíquotas para cada tempo de incubação). * (p<0,05 vs tempo 0, teste t de student)

4.4. Concentração de albumina

A variação na concentração de albumina plasmática entre 3,5 e 7,0 mg/dL não alterou a transferência de lipídeos da LDE para a HDL3, conforme mostra a figura 3.

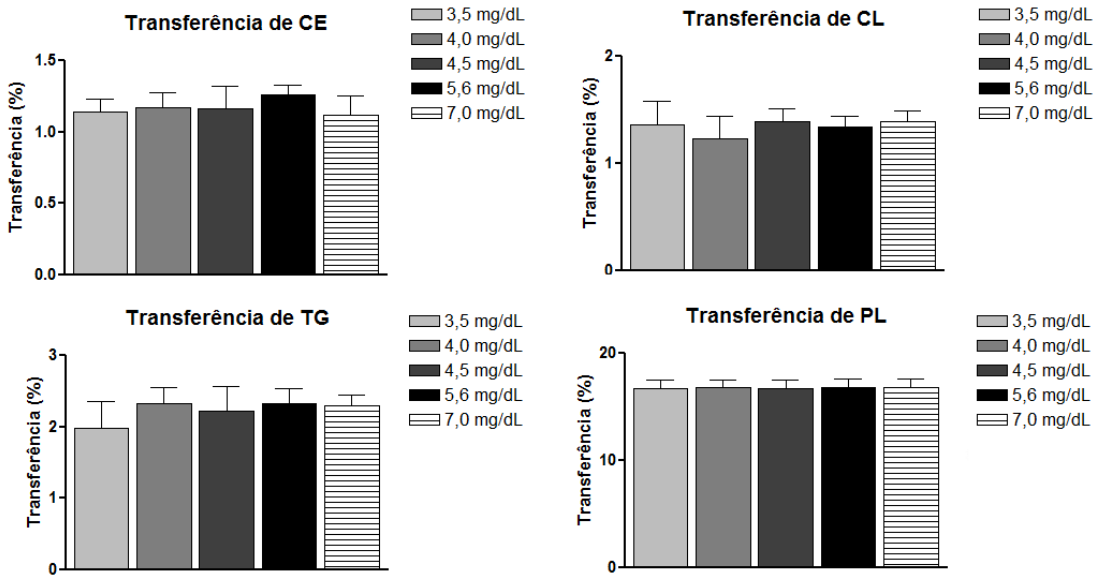

Figura 3: Efeito da variação na concentração de albumina entre 3,5; 4,0; 4,5; 5,6; e 7,0 mg/dL sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95% (n=5 alíquotas para cada concentração).

4.5. Efeito da concentração de HDL-C

O acréscimo de quantidades crescentes de colesterol de HDL de 33 a 244 mg/dL promove aumento na transferência de todos os lipídeos da nanopartícula doadora para a HDL3 (figura 4).

4.6. Validação intra- e inter-ensaio

A análise da precisão intra-ensaio da transferência de lipídeos para a HDL3 apresentou coeficientes de variação de 2,3, 1,2, 0,5 e 1,4% para a transferência de CE, CL, TG e PL, respectivamente. Na análise da precisão inter-ensaio, os valores para os mesmos lipídeos supracitados foram respectivamente de 2,5, 1,5, 0,8 e 2,0 %.

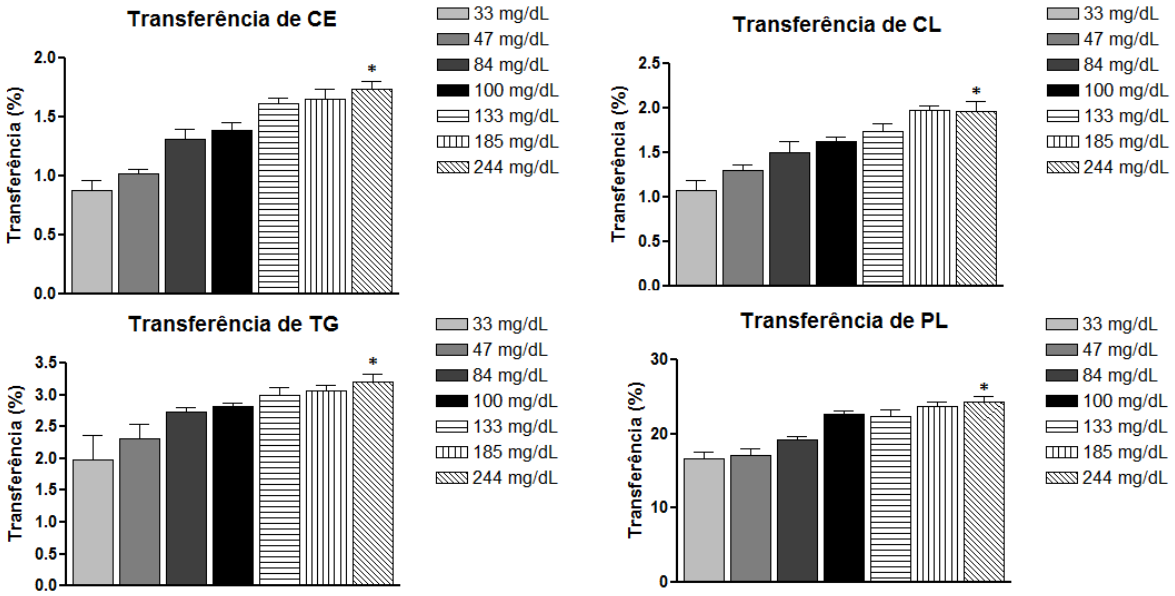

Figura 4: Efeito da variação na concentração de HDL-C entre 33; 47; 84; 100; e 133; 185; e 244 mg/dL sobre a transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3. Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95% (n=5 alíquotas para cada concentração). * (p<0,001 vs 33 mg/dL).

4.7. Características clínicas e laboratoriais

Não houve diferença nos valores de idade, IMC, HDL-C, LDL-C, TG, apo A-1, e Apo-B, CETP, LCAT e PLTP entre os grupos controle e DAC. Entretanto, o grupo de portadores de DAC apresentou maiores valores de colesterol total e colesterol livre em relação ao grupo controle, conforme mostra a tabela 2.

4.8. Transferência de lipídeos

Não houve diferença entre os grupos DAC e controle em relação aos valores de transferência de colesterol, TG, CE e PL para a HDL (tabela 3). Entretanto, a transferência de CE e PL para a HDL3 foi maior no grupo DAC em relação ao grupo controle. A transferência de TG para a HDL3 foi maior no grupo controle em relação ao grupo DAC (figura 5).

	Controle	DAC
Idade	58 ±11	61±7
IMC	27±4	30±5
CT	177±20	220±80*
HDL-C	37±8	35±5
LDL-C	143±30	130±35
TG	170±70	167±61
CL	34±6	51±10*
Apo A-1	132±30	130±16
Apo B	93±30	90±15
CETP	72±25	68±23
PLTP	17±5	19±11
LCAT	2,9±0,5	2,6±0,5

Tabela 2 Características clínicas e bioquímicas dos portadores de doença arterial coronária (DAC) e dos indivíduos saudáveis (grupo controle). Idade em anos. IMC = índice de massa corporal. CT (mg/dL) = colesterol total. HDL-C (mg/dL) = colesterol de HDL. LDL-C (mg/dL) = colesterol de LDL. TG (mg/dL) = triacilglicerol. CL (mg/dL) = colesterol livre. Apo A-1 (mg/dL) = apolipopeína A-1. Apo B (mg/dL) = apolipoproteína B. CETP (atividade em pmol/µL/h) = proteína de transferência de ésteres de colesterol. PLTP (atividade em pmol/µL/h) = proteína de transferência de fofolipídeos. LCAT (unidades arbitrárias) = lecitina colesterol- aciltransferase. Valores expressos em média ± desvio padrão. * ($p<0,05$, teste t de student) vs controle.

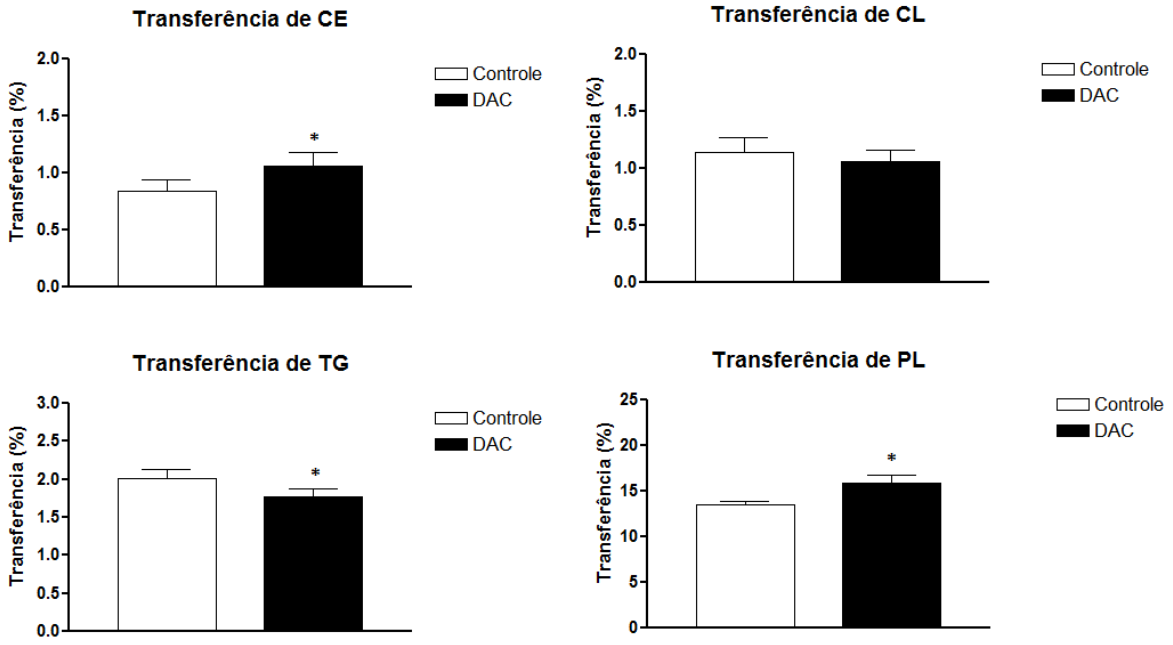

Figura 5: Porcentagem de transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL3 de pacientes portadores de doença arterial coronária (DAC, n=45) e indivíduos saudáveis (grupo controle, n=45) Valores expressos em média ± intervalo de confiança de 95%. * (p<0,001 vs controle, teste t de student).

Devido à ausência de diferença entre os valores de transferência para HDL entre os grupos DAC e controle, os valores calculados de transferência de CE e PL para a HDL2 apresentaram-se diminuídas no grupo DAC em relação ao controle, enquanto que os valores de transferência de TG foram maiores (tabela 3).

Controle	^{3}H TG	^{14}C CL	^{3}H CE	^{14}C PL	**DAC**	^{3}H TG	^{14}C CL	^{3}H CE	^{14}C PL
HDL	4,9±0,9	8,2±1,3	4,3±0,5	26±1,1	**HDL**	5±0,3	8±1,4	4,1±0,8	25±1,7
HDL3	2±0,05	1,1±0,06	0,84±0,04	13,5±0,15	**HDL3**	1,77±0,04*	1,0±0,04	1,0±0,06*	15,8±0,44*
HDL2	2±0,85	7,1±1,2	3,4±0,46	12,5±0,95	**HDL2**	3,23±0,26*	7±1,36	3,1±0,74*	9,2±1,26*

Tabela 3: Porcentagem de transferência de colesterol esterificado (CE), colesterol (CL), fosfolipídeos (PL) e triacilglicerol (TG) para a HDL e HDL3 de pacientes portadores de doença arterial coronária (DAC, n=45) e indivíduos saudáveis (grupo controle, n=45) e valores teóricos de porcentagem de transferência para a “HDL2”. Valores expressos em média ± desvio padrão. * (p<0,001 vs controle).

4.9. Capacidade antioxidante da HDL

Para determinar as concentrações ideais de CuSO4, amostras de indivíduos saudáveis foram obtidas e 50 mg/mL de LDL foram incubados com diferentes concentrações de CuSO4, variando entre 0,5 e 50 µM em triplicata. Neste ensaio, espera-se obter uma curva que apresenta as características mostradas na figura 6, onde é possível observar uma fase inicial de resistência à oxidação ("lag phase") na qual a absorbância se mantém relativamente constante seguida de uma fase de propagação ("propagation phase"), que apresenta um aumento contínuo na formação de dienos conjugados e finalmente a fase de estabilização e decomposição, onde a curva atinge um "plateau" e os valores posteriormente tendem a diminuir.

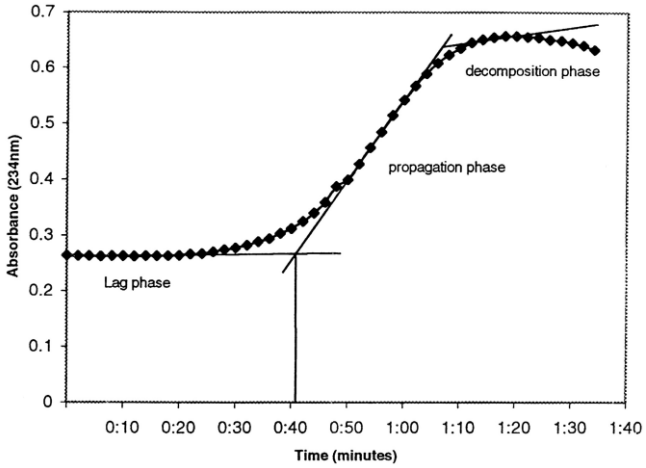

Figura 6. Perfil típico da cinética de oxidação da LDL induzida por CuSO4 determinada pela mensuração da absorbância à 234 nm que aumenta em função da produção de dienos conjugados (Figura obtida do artigo de Ashton L. ET al 2000).

Não foi possível observar a fase de resistência à oxidação (*lag time*) em nenhuma das concentrações testadas (figura 7). Entretanto, a partir de 5 µM de CuSO4 foi possível observar a fase de propagação. Nas concentrações acima e abaixo de 25 µM, a formação de dienos conjugados ao longo do tempo apresentou grande irregularidade. Apesar da ausência da fase de resistência à oxidação, a curva obtida nas amostras contendo 25 µM apresentou um constante aumento na

formação de dienos conjugados, seguido de uma fase de estabilização e, portanto esta foi considerada como a concentração de CuSO4 ideal para o ensaio.

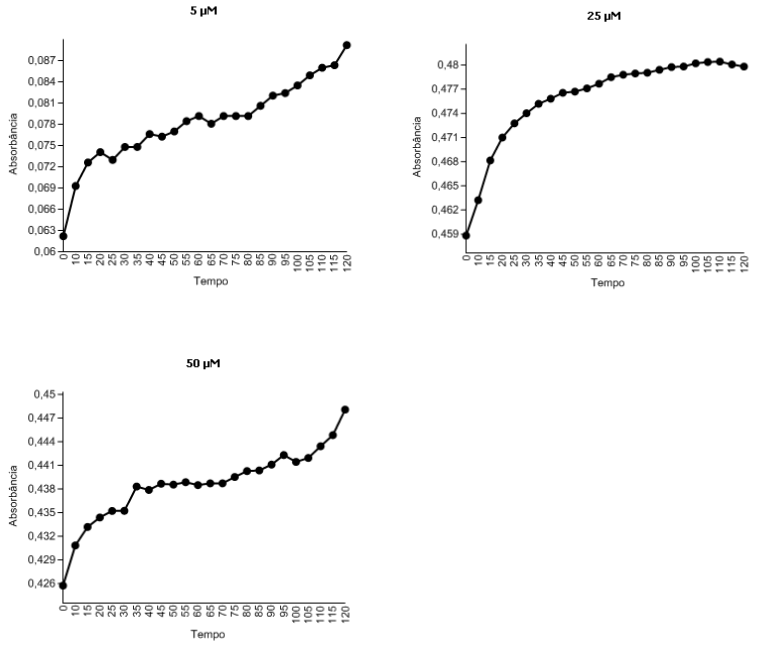

Figura 7. Aumento na absorbância em função do tempo (minutos) após incubação de diferentes concentrações de CuSO4 (5, 25 e 50 µM) com 50 mg/mL de LDL.

Devido à ausência da fase de resistência à oxidação, foi necessário ajustar a concentração de LDL. Para tanto, diferentes concentrações de LDL (entre 50 e 300 mg/mL) foram incubadas com 25 µM de CuSo4. Observou-se o aparecimento e um aumento linear (r=0,95) da fase de resistência à oxidação em função do aumento progressivo das concentrações de LDL (figura 8).

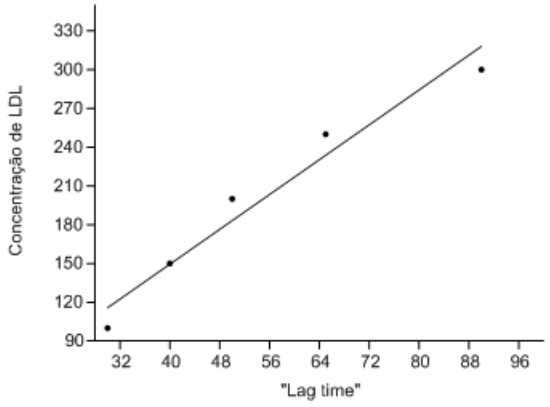

Figura 8. Variação no tempo (minutos) da fase de resistência à oxidação ("lag time") em função da concentração de LDL.

A figura 9 apresenta uma amostra representativa das curvas obtidas após ajuste das concentrações de LDL. A curva apresentou todas as características esperadas em relação à cinética de oxidação da LDL, conforme mostra a figura 6.

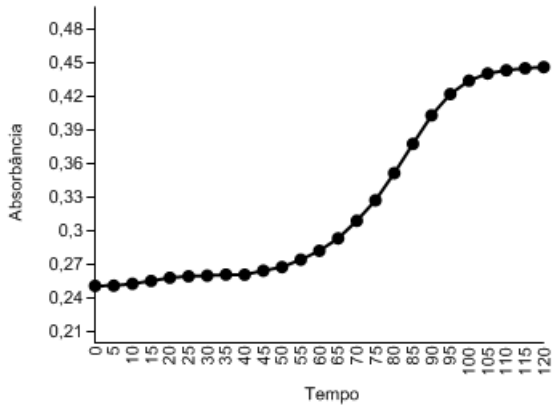

Figura 9. Cinética de oxidação da LDL obtida pela incubação de 200 mg/mL de LDL com 25 µM de CuSO4 (tempo em minutos).

Com base nos resultados obtidos após o ajuste das concentrações de LDL, consideramos que 100 mg/mL de LDL e 25 µM de CuSo4 seriam suficientes para a realização do ensaio da capacidade antioxidante da HDL. Assim, incubamos 200 mg/mL de HDL com LDL e CuSo4 nas concentrações supracitadas. A figura 10

mostra que a presença de HDL resulta em aumento no tempo de resistência à oxidação da LDL conforme esperado.

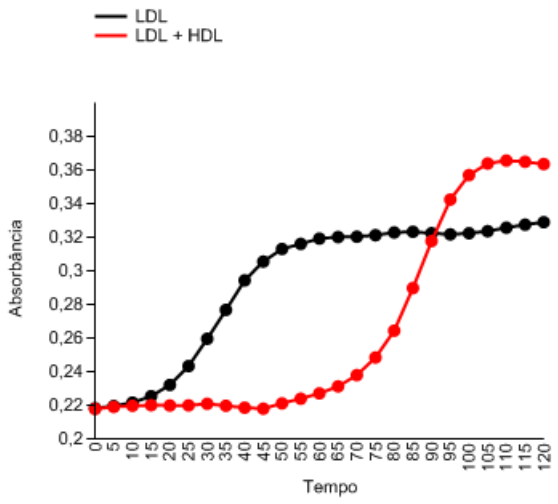

Figura 10. Cinética de oxidação da LDL após incubação de 100 mg/mL de LDL e 25 µM de CuSO4 na presença e na ausência de HDL.

Após a validação do método, foi realizada a análise da capacidade antioxidante da HDL nas amostras dos pacientes com DAC e no grupo controle. A capacidade antioxidante da HDL foi menor no grupo DAC em relação ao grupo controle, conforme mostra a figura 11. Houve uma correlação positiva entre o lagtime e a transferência de CE para a HDL3 (figura 11 C).

4.10. Capacidade antiagregante plaquetária

Não houve diferença entre os grupos DAC e controle em relação à capacidade antiagregante plaquetária da HDL. Entretanto, este parâmetro se correlacionou positivamente com a transferência de lipídeos para a HDL3, conforme mostra a figura 11.

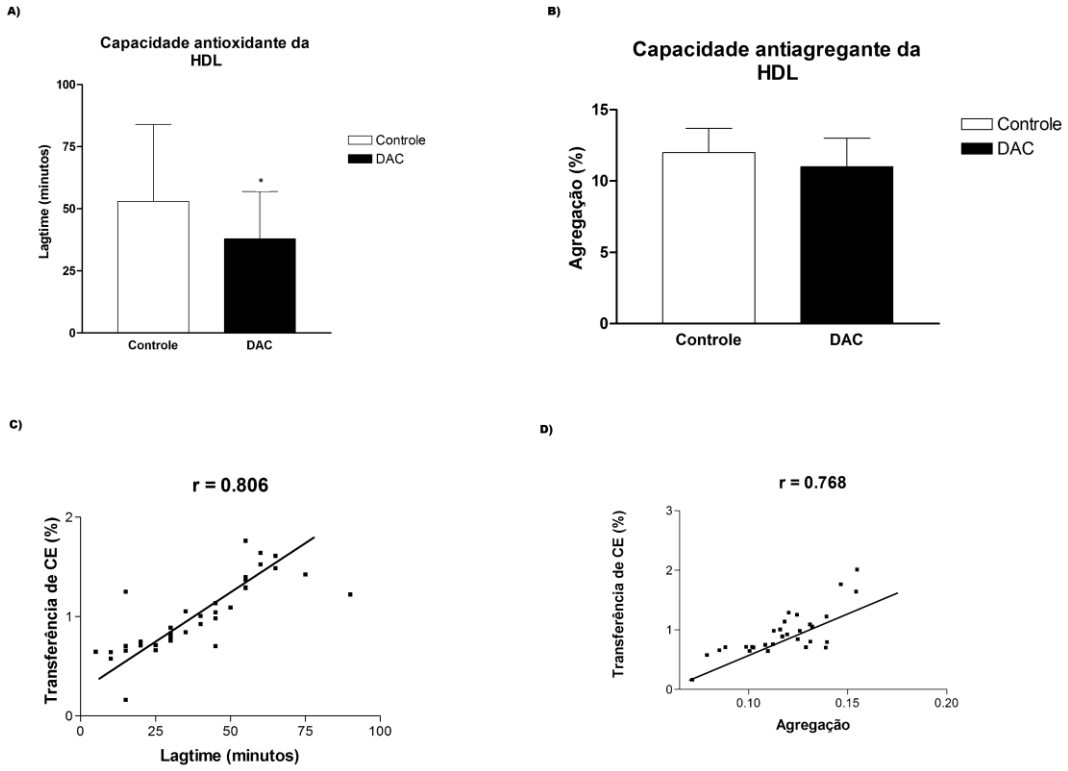

Figura 11: Avaliação da capacidade antioxidante da HDL (A e B) e da capacidade antiagregante plaquetaria da HDL (C e D) nos grupos controle e DAC. * p = 0.0069. C) p < 0.0001. D) p < 0.0001.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apesar da evidente relação inversa entre a concentração plasmática de HDL e o desenvolvimento da doença arterial coronária, as funções da HDL descritas nas últimas décadas sugerem que os aspectos funcionais desta lipoproteína podem ser de grande relevância para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de diagnóstico (CASTELLI *et al*; 1986). Dentre as diversas funções antiaterogênicas atribuídas à HDL, como a sua capacidade anti-inflamatória, antioxidante, e antitrombótica, pode-se considerar que o transporte reverso do colesterol está entre as de maior relevância, pois permite a manutenção do balanço de colesterol em tecidos como a parede arterial (CALMONT *et al*., 2011). A transferência de lípides entre as diferentes classes de lipoproteínas constitui uma importante etapa do transporte reverso do colesterol e tem sido alvo de estudos “in vivo” e “in vitro” (NUNES *et al*., 2001; LASSEL *et al*., 1999) . Entretanto, não há na literatura

informações sobre a capacidade das subfrações de HDL em receber simultaneamente as quatro principais classes de lipídeos de outras lipoproteínas. Deste modo, realizou-se no presente estudo a padronização de um método de grande praticidade para a avaliação de uma importante função da HDL que é a capacidade desta lipoproteína em receber lipídeos, com ênfase na sua principal subfração, a HDL3.

Para a padronização deste método, foi realizada a análise de possíveis variáveis que possam afetar na transferência de lipídeos para a HDL3. A análise da influência da temperatura de incubação da LDE com a amostra de plasma mostrou que há aumento na transferência dos quatro lipídeos para a HDL3, com maior intensidade no intervalo entre 0 e 37 °C. De fato, o aumento da temperatura promove uma maior movimentação das partículas, aumentando a frequência de colisões entre as mesmas, e adicionalmente, os lipídeos apresentam maior flexibilidade em suas conformações na presença de temperaturas mais elevadas (CHIU *et al* 1995). Não obstante, acima de 37 °C o aumento na transferência ocorreu com menor intensidade. É provável que acima desta temperatura ocorra início de desnaturação de proteínas envolvidas na transferência de lipídeos, como por exemplo, a PLTP, que se apresenta totalmente desnaturada aos 57 °C (LALANNE & PONSIN, 2000). De modo semelhante ao presente estudo, outros trabalhos reportaram a possibilidade de transferência de lipídeos entre 0 e 4 °C (LALANNE & PONSIN, 2000; EISENBERG, 1978).

A variação de pH do plasma entre 6,5 e 8,0 não altera a transferência de lipídeos da LDE para a HDL3. De fato, estudos prévios demonstram que a atividade de proteínas como a PLTP, que promove a transferência de fosfolipídeos, não sofre alterações entre 5,5 e 9,0 de pH. A ausência de variação na transferência em função de alterações do pH pode ser explicada pela ampla faixa de pH em que

muitas proteínas se mantém estáveis (DESRUMAUX *et al*., 1998). O aumento no tempo de incubação entre 0 e 120 minutos resulta em redução a transferência de CE para a HDL3 acima de 60 minutos de incubação. É possível que durante a incubação, parte das partículas de HDL3 sejam convertidas em HDL2 pela ação de proteínas de transferência e pelo maior tempo de contato com o sistema doador de lipídeos e as demais lipoproteínas. O precipitante utilizado neste método promove a precipitação das partículas de HDL2, resultando em menor quantidade de HDL3 no sobrenadante (HIRANO *et al* 2008). O aumento na transferência de PL para a HDL3 em função do tempo de incubação sugere que o maior tempo de contato entre a LDE e a HDL auxilia na transferência de lipídeos, devido ao aumento nas colisões entre as partículas e o maior tempo de exposição às proteínas de transferência, particularmente a PLTP. A ausência de alteração na transferência de colesterol em função do tempo de incubação pode ter ocorrido devido à ação da LCAT, que promove rápida esterificação deste colesterol, sendo que a HDL3 poderá ser convertida em HDL2 e este colesterol ser precipitado, conforme citado acima. Assim, o tempo de incubação de 1 hora foi escolhido para a avaliação simultânea de todos os lipídeos, evitando divergência nos valores de transferência entre lipoproteínas expostas a diferentes períodos de contato.

A adição de concentrações de albumina não alterou a transferência de lipídeos para a HDL3. Apesar do importante papel da albumina como transportador de ácidos graxos, outros estudos da literatura também reportam a ausência de alterações na transferência de lipídeos na presença desta proteína (HANKINS, 2006; LAGROST *et al* 1995). Assim, é provável que os fatores determinantes para a transferência de lipídeos no presente ensaio sejam o choque entre as partículas e a atividade de proteínas de transferência como a CETP e a PLTP.

Dados da literatura indicam que em ensaios de transferência de lipídeos entre lipoproteínas, tanto a concentração das lipoproteínas doadoras como a das aceptoras influenciam na taxa de transferência (MARCEL *et al*., 1980) . De modo semelhante, observamos que o acréscimo de HDL-C promoveu aumento na transferência de todos os lipídeos para a HDL3, provavelmente devido à maior proporção de partículas receptoras em relação às partículas doadoras. Assim, lipídeos que poderiam ser transferidos para outras lipoproteínas são transferidos em maior quantidade para a HDL.

A análise de variação intra e interensaio mostra que o método é preciso, visto que o coeficiente de variação foi menor que 5% para todos os lipídeos, sendo esta a porcentagem mínima aceitável para métodos analíticos (LO PRETE *et* al. 2009).

Para avaliar o potencial da metodologia aqui descrita como ferramenta de estudo de distúrbios funcionais da HDL, a transferência de lipídeos para a HDL e para a HDL3 foi avaliada em 45 portadores de doença arterial coronária e 45 indivíduos saudáveis. Os valores de transferência de colesterol, PL, TG e CL para a HDL total estão de acordo com os valores relatados em estudos prévios realizados em nosso laboratório. A análise da transferência de lípides para a HDL e suas subfrações, mostrou que a subfração HDL3 recebe a maior parte dos fosfolipídeos da nanopartícula doadora. De fato, as partículas de HDL3 apresentam-se em maior quantidade em relação à HDL2 (HIRANO *et al*., 2008). Além disso, são partículas de menor tamanho e com menor quantidade de fosfolipídeos, apresentando assim maior capacidade de acomodar lipídeos adicionais tanto em sua superfície quanto em seu interior (INDER *et al*., 2007; ROSENSON, 2011) . Não obstante, a transferência de PL para a HDL3 foi maior no grupo DAC em relação ao grupo controle. Surpreendentemente, esta alteração

ocorreu mesmo na ausência de diferenças na atividade da PLTP entre os dois grupos estudados. Tal observação pode ser consequência de alterações na composição da HDL destes indivíduos. De fato, há evidências de que alguns fatores de risco para DAC estão associados com alterações na quantidade e na composição de fosfolipídeos da HDL e de suas subfrações, o que pode ter influenciado os resultados observados no presente estudo (SCHÄFER *et al* 2007). Adicionalmente, a maior transferência de CE para a HDL3 nos pacientes com DAC em relação ao grupo controle pode estar relacionada com a maior transferência de PL observada. Presumivelmente, a maior quantidade de CE recebida pela HDL3 aumenta a demanda desta lipoproteína por lipídeos de superfície, incluindo os fosfolipídeos. Os resultados do presente estudo sugerem que a HDL2 dos pacientes com DAC apresenta menor capacidade de receber PL e CE e desde modo, é possível que neste grupo de pacientes, a conversão das partículas de HDL3 em HDL2 esteja comprometida, resultando em menor eficiência do transporte reverso do colesterol. De fato, os valores de lagtime, que indicam a capacidade antioxidante da HDL, se correlacionaram positivamente com a transferência de CE para a HDL3, sugerindo que o enriquecimento excessivo destas partículas com CE poderia prejudicar a transferência de hidroperóxidos lipídicos da LDL para a HDL. Presumivelmente, a interação entre as plaquetas e a HDL também pode estar relacionada com a transferência de lipídeos entre a LDL e a HDL, devido à relação inversa entre a transferência de lipídeos para a HDL2 e a agregação plaquetária nos pacientes com DAC. Assim, o presente trabalho levanta a hipótese de que um aumento da transferência de PL concomitante ao aumento na transferência de CE para a HDL3 seria um indicativo de disfunção na fração HDL e deste modo, estudos posteriores são necessários para melhor esclarecer esta questão. A ausência de alterações na transferência de colesterol para a HDL3

sugere que a esterificação do colesterol pela LCAT ocorre de maneira eficiente em ambos os grupos estudados. Assim, no presente ensaio *in vitro*, a maior parte do colesterol que não foi esterificado parece ser precipitada nas partículas de HDL2 após a sua maturação. De fato, não houve alterações na atividade da LCAT em ambos os grupos estudados. A maior transferência de TG da LDE para a HDL3 no grupo controle em relação ao grupo de pacientes com DAC pode ter ocorrido devido a maior transferência de triglicérides da HDL2 para as lipoproteínas que contém apo B no grupo controle, embora os dois grupos não tenham apresentado diferenças na atividade de CETP ou nas concentrações de LDL-C e de TG. O aumento na transferência de TG para a HDL2 está associado a maior degradação das partículas de HDL, pois o enriquecimento de TG aumenta a susceptibilidade destas partículas à atividade da lípase hepática, podendo levar a posterior degradação das partículas de HDL (ROSENSON, 2011).

Assim, o método desenvolvido no presente estudo é prático, preciso e de potencial relevância como ferramenta no estudo dos distúrbios de função da HDL.

6. REFERÊNCIAS

BAGINSKY ML, BROWN WV. Differential characteristics of purified hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase from human postheparin plasma. **J Lipid Res**, v. 18, p.423-437, 1977.

BENOIT J. ARSENAULT, S. MATTHIJS BOEKHOLDT & JOHN J. P. KASTELEIN Lipid parameters for measuring risk of cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology,** p. 197-206, 2011.

BERG, K, A new serum type system in man: the Lp-system. **Acta Pathol. Microbiol. Scand,** v. 59, p. 369–382, 1963.

BOBRYSHEV, Y. V.; LORD, R. S. A. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. **Cardiovasc Res**, v. 29, p. 689-696, 1995.

BROWN MS, KOVANEN PT, GOLDSTEIN JL.Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. **Science**, v. 212, p. 628-635, 1981

CAMONT L, CHAPMAN MJ, KONTUSH A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease.Trends **Mol Med,** v. 17, p. 594-603, 2011.

CASELLA-FILHO A, CHAGAS AC, MARANHÃO RC, TROMBETTA IC, CESENA FH, SILVA VM, TANUS-SANTOS JE, NEGRÃO CE, DA LUZ PL. Effect of exercise

training on plasma levels and functional properties of high-density lipoprotein cholesterol in the metabolic syndrome. **Am J Cardiol**. v. 15, p. 1168-1172, 2011.

CASTELLI, W. P.; GARRISON R. J.; WILSON, P. W.; ABBOT R. D.; KALOUSDIAN, S. KANNEL, W. B. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. ***JAMA*.** v. 20, p. 2835-2838, 1986.

CHIU, S. W; CLARK, M.; BALAJI, V.; SUBRAMANIAM, S. Incorporation of surface tension into molecular dynamics simulation of na interface: a fluid phase lipid bilayer membrane. **Biophys J**, v. 69, p. 1230-1245, 1995.

CHAPMAN, M.J. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. **Journal of Lipid Research,** 1981.

COHN, E. J., STRONG, L. E., HUGHES, W. C., MULFORD, D. J., ASHWORTH, J. N., MELIN, M. & TAYLOR, H. L. Preparation and properties of serum and plasma a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolyproteins. IV. A system for the separation into fractions of the proteins and lipoprotein components of biological tissues and fluids**. J. Am. Chem. Soc**, v. 68, p. 459–475, 1946.

da SILVA JL, VINAGRE CG, MORIKAWA AT, ALVES MJ, MESQUITA CH, MARANHÃO RC. Resistance training changes LDL metabolism in normolipidemic subjects: A study with a nanoemulsion mimetic of LDL. **Atherosclerosis**, 2011.

DERUMAUX, C.; ATHIAS, A.; MASSON, D.; GAMERT, P LALLEMANT, C.; LAGROST, L. HANKINS, J. The role of albumin in fluid and electrolyte balance. **J Infus Nurs**, v. 29, p. 260-265, 2006.

DESAI, K.; BRUCKDORFER K. R.; HUTTON R. A. and OWEN; J. S. Binding of apoE-rich high density lipoprotein particles by saturable sites on human blood platelets inhibits agonist-induced platelet aggregation. **Journal of Lipid Research.** v. 30, p.831-840, 1989.

DUCHATEAU PN, PULLINGER CR, ORELLANA RE, KUNITAKE ST, NAYA-VIGNE J, O'CONNOR PM, MALLOY MJ, KANE JP. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. **J Biol Chem**, v. 10, p. 25576-2582,1997.

EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. **J. Lipid Res**, v. 25, p. 1017-1058, 1994.

ESTERBAUER H, PUHL H, DIEBER-ROTHENEDER M, *et al*. Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. **Ann Med**, v. 5, p. 573–581, 1991.

GINSBURG, G. S.; SMALL, D. M.; ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. **J Biol Chem.** v. 257, p. 8216, 1982.

GORDON D.J.; RIFKIND BM. High-density lipoprotein - the clinical implications of recent studies. **N Engl J M*ed*.** v. 19, p. 1311-1316, 1989.

HASSALL, D. G.; OWEN J. S.; BRUCKDORFER, K. R. The aggregation of isolated human platelets in the presence of lipoproteins and prostacyclin. **Biochemical Journal**. p. 43-49, 1983.

HIRANO, T, Nohtomi K, Koba S, Muroi A, Ito Y. A simple and precise method for measuring HDL-cholesterol subfractions by a single precipitation followed by homogenous HDL-cholesterol assay. **Journal of Lipid Research,** 2008.

HUSSAIN MM, SHI J, DREIZEN P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. **J Lipid Res**, v. 44, p. 22-32, 2003.

INDER, M. SINGH, M. Ansell, B. J. High-Density Lipoprotein as a Therapeutic Target A Systematic Review. **JAMA**. v. 298, 2007.

JONASSON, L. et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. **Arteriosclerosis**, p. 131-138, 1986.

KAMEDA S, SAKATA T, KOKUBO Y, MITSUGURO M, OKAMOTO A, SANO M, MIYATA T. Association of platelet aggregation with lipid levels in the Japanese population: the Suita study. **J Atheroscler Thromb,** v. 7, p. 560-567, 2011.

KONTUSH, A.; CHAPMAN, M. J. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focuson antioxidative activities. **Current Opinion in Lipidology**, v. 21, p. 312–318, 2010.

KOVANEN, P. T.; KAARTINEN, M.; PAAVONEN, T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. **Circulation**, v. 92, p. 1084-1088, 1994.

LALANNE, F.; PONSIN, G. Mechanism of the phospholipid transfer pein-mediated transfer of phospholipids from model lipid vesicles to high density lipoproteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1487, p. 82-91, 2000.

LASSEL, T. S.; GUERIN, M.; AUVOIRON, S.; CHAPMAN, M. J. Evidence for cholesteryl ester donor activity of LDL particles during alimentary lipemia in normolipidemic subjects. **Atherosclerosis**, v. 147, p. 41-48, 1999.

LEVY, E. The 1991 Borden Award Lecture. Selected aspects of intraluminal and intracellular phases of intestinal fat absortion. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 70, p. 413-419, 1992.

LO PRETE AC, DINA CH, AZEVEDO CH, PUK CG, LOPES NH, HUEB WA, MARANHÃO RC. In vitro simultaneous transfer of lipids to HDL in coronary artery disease and in statin treatment. **Lipids**, v. 44, p. 917-924, 2009.

LOWE ME. The triglyceride lipases of the pancreas. **J Lipid Res**, v. 43, p. 2007-2016, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, p. 1135-1143, 2002.

LIMA, E. S.; MARANHÃO, R. C. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. **Clin Chem.** v. 50, p. 1086-1808, 2004.

MARANHÃO, R. C.; TERCYAC, A. M.; REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol contento on metabolism of protein-free emulsion models of lipoprotein. **Biochem. Biophys Acta**, v. 875, p. 247-255, 1986.

MARANHÃO, R. C.; CESAR, T. B.; PEDROSO-MARIANI, S.; HIRATA, M. H.; MESQUITA, C. H. Metabolic behavior in rats of a non-protein microemulsion resembling LDL. **Lipids.** v. 28, p. 691-696, 1993.

MARANHÃO R. C.; ROLAND, I. A.; TOFFOLETTO, O.; RAMIRES, J. A.; GONÇALVES, R. P.; *et al*. Plasma kinetics behaviour in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. **Lipids**, v. 32, p. 627-633, 1997.

MINEO C, SHAUL PW. Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. **Circ Res,** v. 8, p. 1079-1090, 2012.

MARCEL YL, VEZINA C, TENG B, SNIDERMAN A. Transfer of cholesterol esters between human high density lipoproteins and triglyceride-rich lipoproteins controlled by a plasma protein factor. **Atherosclerosis**, v. 35, p. 127-133, 1980.

MINEO C, SHAUL PW. Novel biological functions of high-density lipoprotein cholesterol. **Circ Res**, v. 111, p. 1079-1090, 2012.

NUNES, V. S.; QUINTÃO, E. C. CAZITA, P. M. *et al*.; Plasma lípases and lipid transfer proteins increase phospholipid but not free cholesterol transfer from lipid emulsion to high density lipoproteins. **BMC Biochem**, v. 2, 2001.

NISSEN S. E.; TARDIF J. C.; NICHOLLS S. J. *et al*. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. **N Engl J Med.** v. 13, p. 1304-1316, 2007.

NOFER JR, BRODDE MF, KEHREL BE. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 7, p. 726-735, 2010.

NORDOY, A.; REFSUM, N.; THELLE, D.; JAEGER, R. Platelet function and serum high density lipoprotein. **Thromb Haemostasis**. p. 1181-1186, 1979.

O'DONNELL CJ1, LARSON MG, FENG D, SUTHERLAND PA, LINDPAINTNER K, MYERS RH, D'AGOSTINO RA, LEVY D, TOFLER GH. Genetic and environmental contributions to platelet aggregation: the Framingham heart study. **Circulation,** v. 25, p. 3051-3056, 2001.

OLSON, R. E. Discovery of the Lipoproteins, Their Role in Fat Transport and Their Significance as Risk Factors. **J. Nutr**, v. 128, p. 439S–443S, 1998.

PENNACCHIO LA, OLIVIER M, HUBACEK JA, COHEN JC, COX DR, FRUCHART JC, KRAUSS RM, RUBIN EM. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. **Science**, v. 294, p. 169-173, 2001.

PUK CG, BOCCHI EA, LO PRETE AC, FERREIRA SM, STOLF NA, MARANHÃO RC. Transfer of cholesterol and other lipids from a lipid nanoemulsion to high-density lipoprotein in heart transplant patients. **J Heart Lung Transplant,** v. 10, p. 1075-1080, 2009.

REDGRAVE, T. G; MARANHÃO, R. C; Metabolismo of protein-free emulsion models of chylomicrons in rats. **Bioch Biophys Acta**, n. 1, p. 104-112, 1985.

ROSENFELD L. Lipoprotein analysis. Early methods in the diagnosis of atherosclerosis. **Arch Pathol Lab Med,** v. 113, p. 1101-1110, 1989.

ROSENSON R, S. HDL Measures, Particle Heterogeneity, Proposed Nomenclature, and Relation to Atherosclerotic Cardiovascular Events. **Clinical Chemistry**, v. 57, p. 392–410, 2011.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 115-126, 1999.

RUGGERI, Z. M. Platelets in atherothrombosis. **Nat Med**, v. 11, p. 1227-1234, 2002.

SHAEFER, E. J.; EISENBERG, S.; LEVY, R. I. Lipoprotein apoprotein metabolism. **J. Lipid Res**, v. 19, p. 667-687, 1978.

SCHÄFER C, PARLESAK A, ECKOLDT J, BODE C, BODE JC, MÄRZ W, WINKLER K. Beyond HDL-cholesterol increase: phospholipid enrichment and shift from HDL3 to HDL2 in alcohol consumers. **J Lipid Res**, v. 48, p. 1550-1558, 2007.

SIGAL GA, MEDEIROS-NETO G, VINAGRE JC, DIAMENT J, MARANHÃO RC. Lipid metabolism in subclinical hypothyroidism: plasma kinetics of triglyceride-rich lipoproteins and lipid transfers to high-density lipoprotein before and after levothyroxine treatment. **Thyroid**, v. 21, p. 347-353, 2011.

TALL AR, FORESTER LR, BONGIOVANNI GL. Facilitation of phosphatidylcholine transfer into high density lipoproteins by an apolipoprotein in the density 1.20-1.26 g/ml fraction of plasma. **J Lipid Res,** v. 3, p. 277-289. 1983.

VINAGRE JC, VINAGRE CG, POZZI FS, SLYWITCH E, MARANHÃO RC. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and transfer of lipids to high-density lipoproteins (HDL) in vegan and omnivore subjects. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 2011.

WILLIAMS KJ, TABAS I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 5, p. 551–561, 1995.

ZERRAD-SAADI A, THEROND P, CHANTEPIE S, COUTURIER M, RYE KA, CHAPMAN MJ, KONTUSH A. HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 12, p. 2169–2175, 2009.