UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Captação de uma emulsão lipídica semelhante a LDL por
fragmentos vasculares e pericárdio de pacientes submetidos a
cirurgia de revascularização miocárdica**

Ricardo David Couto

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

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

**São Paulo
2002**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C871c Couto, Ricardo David
Captação de uma emulsão lipídica semelhante a LDL por
por fragmentos vasculares e pericárdio de pacientes submetidos
a cirurgia de revascularização miocárdica / Ricardo David
Couto. -- São Paulo, 2002.
83p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Maranhão, Raul Cavalcante

1. Bioquímica clínica : Medicina 2. Metabolismo lipídico
3. Doenças metabólicas : Medicina I. T. II. Maranhão, Raul
Cavalcante, orientador.

616.0756 CDD

Ricardo David Couto

Captação de uma emulsão lipídica semelhante a LDL por
fragmentos vasculares e pericárdio de pacientes submetidos a
cirurgia de revascularização miocárdica

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. TIT. Raul Cavalcante Maranhão
orientador/presidente

Prof. Dr. Raul Dias Santos
1º examinador

Profa. Dra. Ana Campa
2º examinador

São Paulo, 08 de fevereiro de 2002.

“Del Señor es la tierra y su plenitude”

Talmude Babilónico

**A D'US, bendito seja, por permitir
a realização deste trabalho.**

**Ao meu bisavô Hanoch David Pandiott (Henrique David)
Shochet, Razan e Baal Core,
de bendita memória,
pelo estímulo
ao estudo**

**Ao meu avô Henrique David Filho, de bendita memória,
pela educação dentro dos princípios
éticos e morais judaicos
transmitidos durante
a minha infância**

**A minha Avó Elza David
pela presença, pelo amor
e pelo carinho**

**A minha mãe Elenir e ao meu pai Antonio
pelo amor, carinho e incentivo
em todos os momentos
da minha vida.**

**Ao meu único irmão Dr. Fábio David Couto Bsc, MS,
estudante do programa de doutoramento da FIOCRUZ,
pelo amor, companheirismo e por trilhar
de forma esplêndida os árduos
caminhos da pesquisa.**

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Titular Raul C. Maranhão pela amizade, atenção, paciência e pelo incentivo como orientador deste trabalho e de muitos outros que ainda virão.

Unidade de Cardiopatias Congênitas InCor-HCFM-USP:

- Ao Prof. Titular Sérgio A. de Oliveira pela colaboração e incentivo indispensáveis à realização deste trabalho e pela atenção em todos os momentos necessários.
- Ao Prof. Dr. Luis A. Oliveira Dallan pela colaboração indispensável, amizade, orientação, incentivo, atenção e presença em todos os momentos da realização deste trabalho.
- Ao Dr. Luiz A. Ferreira Lisboa pela colaboração, amizade, atenção e incentivo durante a realização deste trabalho.
- A Sra. Malú Ribeiro (secretária) pela amizade, atenção e pelo auxílio indispensável à realização deste trabalho.

Unidade de Controle do Paciente Cirúrgico InCor-HCFM-USP:

- Ao Dr. Lauro Takumi Kawabe pela colaboração, amizade, auxílio e paciência durante a seleção dos pacientes deste trabalho.
- A Sra. Ana Maria Piesco M. da Costa (secretária) pela atenção, amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.
- A Sra. Marisa do Carmo Siqueira (secretária) pela atenção, amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.

Laboratório de Metabolismo de Lípidos- InCor-HCFM-USP

- A Dra. Carmem Vinagre pela amizade, assistência técnica e incentivo em todas as etapas da realização deste trabalho.
 - Ao Dr. Roberto Shireiber pela amizade, pelo desenvolvimento e auxílio nas técnicas de biologia molecular e incentivo em todas as etapas da realização deste trabalho.
 - A Dra. Claudete Valduga pela amizade, pelo incentivo e auxílio durante a revisão final deste manuscrito.
 - As Dra(s). Débora Rodrigues e Denise Fernandes pela amizade, carinho e incentivo em todas as etapas da realização deste trabalho.
 - A Dra(s). Maria Conceição e Rosangela pela amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.
 - Ao Renato, a Ana Cristina e a Dra. Débora Deus pela amizade, paciência e pelo suporte técnico para a preparação da LDE.
 - As amigas Dra(s) Kátia, Camila, Aleksandra, Raquel e a Elisabeth pela amizade, atenção e auxílio durante o programa de pós-graduação.
 - Ao Dr Raul Dias Santos pela amizade, estímulo e atenção durante a elaboração deste manuscrito.
 - Ao Prof. Dr. Jayme Dyament pela amizade, atenção e pelo valoroso auxílio no direcionamento deste trabalho e preparo deste manuscrito.
-
- FCF/USP
-
- Aos Professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela atenção, paciência e por serem responsáveis pelo aprimoramento de jovens que procuram as carreiras acadêmica e científica.
 - Especialmente a Profa. Dra. Ana Campa pela amizade e pelos conselhos durante o programa de pós-graduação.

- A Profa. Dra. Primavera – Coordenadora do Programa de pós-graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, pela atenção sempre que necessária.
- As secretárias da pós-graduação (B17), Sras. Márcia, Suely e Ana pela atenção e amizade.
- A secretaria de pós-graduação (B13-A), Sras. Benê e Elaine pela atenção, paciência e amizade desde o início do programa de pós-graduação e ao Sr. Jorge Lima pela amizade, paciência e por ter me acolhido como irmão em sua residência e família.
- Ao Sr. Paulo Carvalho, a Sra. Lígia Carvalho, o Neto e a Mami por me receberem como filho e com muito carinho em sua família desde quando cheguei em São Paulo.
- Ao Prof. Oscar Manuel de Castro Ferreira pela amizade, paciência e ensinamentos durante a revisão ortográfica deste manuscrito.
- A CAPES (bolsa de estudos) e a FAPESP pelo suporte para a realização deste estudo.
- **Aos pacientes que participaram deste estudo pela confiança depositada em mim e pelo sacrifício pessoal .**

ÍNDICE

ÍNDICE

LISTAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS VASCULARES.....	1
1.2. ARQUITETURA VASCULAR NORMAL.....	2
1.3. CÉLULAS DA PAREDE VASCULAR.....	3
1.4. CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	3
1.5. CÉLULAS MUSCULARES LISAS.....	4
1.6. ESTENOSE DA INTIMA E RESPOSTA À LESÃO VASCULAR.....	5
1.7. ATHEROSCLEROSE.....	6
1.8. INFLAMAÇÃO E ATHEROSCLEROSE.....	8
1.9. SIGNIFICÂNCIA CLÍNICA.....	8
1.10. DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA.....	10
1.11. FATORES DE RISCO PARA A DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA.....	10
1.12. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA.....	11
1.13. TRANSPORTE DO COLESTEROL, LÍPIDES, LIPOPROTEÍNAS E ATHEROSCLEROSE.....	13
1.14. TRANSPORTE DO COLESTEROL.....	16
1.15. TRANSPORTE EXÓGENO DE LÍPIDES (DIETA).....	16
1.16. TRANSPORTE ENDÓGENO DE LÍPIDES (HEPÁTICO).....	19
1.17. FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS.....	20
1.18. LIPOPROTEÍNAS ARTIFICIAIS E SUAS POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS.....	24
1.19. EMULSÃO LIPÍDICA ARTIFICIAL (LDE).....	25
 2. JUSTIFICATIVA.....	 28
3. OBJETIVOS DO ESTUDO.....	29
4. CASUÍSTICA.....	30
 4.1 OS PACIENTES.....	 30
4.2 PACIENTES SELECIONADOS PARA O ESTUDO.....	31
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	31
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	32
 5 MATERIAL E MÉTODOS.....	 35
 5.1 MATERIAIS UTILIZADOS.....	 35
5.2 ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL.....	36
5.3 PREPARAÇÃO DA LDE MARCADA COM CE- ¹⁴ C E CL- ³ H.....	37
5.4 PROTOCOLO DE ESTUDO.....	38
5.5 DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS.....	39
5.6 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE REMOÇÃO DA LDE.....	39
5.7 ANÁLISE DA CINÉTICA DOS LÍPIDES MARCADOS.....	41
5.8 CÁLCULO DA TAXA FRACCIONAL DE REMOÇÃO.....	42

ÍNDICE

5.9 PROCEDIMENTO CIRURGICO E OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS.....	43
5.10 EXTRAÇÃO DE LÍPIDES.....	44
5.11 GERAÇÃO DO ÉSTER DE COLESTEROL A PARTIR DO COLESTEROL LIVRE.....	45
5.12 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERIFICAÇÃO DO COLESTEROL LIVRE.....	47
5.13 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	47
5.14 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS DE apo E.....	49
5.15 DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO.....	50
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
6.1 TESTE T.....	51
6.2 ANALISE DE VARIÂNCIA.....	51
6.3 TESTE DE CORRELAÇÃO LINEAR.....	52
7. RESULTADOS.....	53
7.1 LÍPIDES PLASMÁTICOS.....	53
7.2 ESTUDOS CINÉTICOS.....	54
7.3 CAPTAÇÃO DA LDE.....	55
7.4 ESTERIFICAÇÃO DO COLESTEROL.....	58
7.5 GENOTIPAGEM DA apo E.....	59
7.6 ESTUDO DE CORRELAÇÃO.....	61
8. DISCUSSÃO.....	62
9. CONCLUSÕES.....	66
10. ANEXOS A.....	67
10.1 ANEXO B.....	69
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas

ACAT- acil coenzima A: colesterol acil transferase

ANOVA- análise de variância

apo- apolipoproteína

bFGF- fator de crescimento básico de fibroblastos

β -VLDL- remanescentes de VLDL

CCD- cromatografia em camada delgada

CE- colesterol esterificado

CE-¹⁴C - colesterol éster marcado com carbono 14

CE-³H- colesterol éster gerado a partir do CL-³H

CETP- proteína de transferência de éster de colesterol

CL- colesterol livre

CL-³H - colesterol livre marcado com trício

CT-colesterol total

C677- polimorfismo C⁶⁷⁷ → T do gene da MTHFR

DAC- doença arterial coronária

DNA- ácido desoxiribonucleico

HhaI- Enzima de restrição usada para determinar o genótipo da apo E

HDL- lipoproteína de alta densidade

HDL-C- colesterol de HDL

HMGCoA-redutase - 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase

IDL- lipoproteína de densidade intermediária

IFN- γ - interferon gama

(k)- taxa fracional de transferência

Kbq- quilobequerel

KBr- brometo de potássio

LCAT- lecitina colesterol acil transferase

LDE- emulsão lipídica semelhante a LDL

LDL- lipoproteína de baixa densidade

LDL-C- colesterol de LDL

LDL-r- receptor de LDL

LP(a)-lipoproteína (a)

LOX 1 e 2- receptores para LDL oxidada

LLA- leucemia linfóide aguda

LMA- leucemia mielóide aguda

LPL- lipase lipoprotéica

LRP- proteína relacionada ao receptor de LDL

MTHFR- metileno tetrahydro folato redutase

N.S.- não significante

Ox-LDL- LDL oxidada

PCR- reação da polimerase em cadeia

PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas

QM- quilomícrons

RMN- ressonância magnética nuclear

SMC- *Smooth muscle cells* (células musculares lisas)

TFR- taxa fracional de remoção

TG- triglicérides

VLDL- lipoproteína de densidade muito baixa

VLDL-C - colesterol de VLDL

vWf- fator de Von Willebrand

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema hipotético de espessamento intimal, células endoteliais, musculares lisas (camada média) e produção de matriz extracelular. (Modificado de: COTRAN e col. 1999)

Figura 2 - Mecanismo da aterogênese – Lipoproteínas portadoras de apo B-100 - LDL, β -VLDL (remanescentes de VLDL), Lp(a), o HDL no transporte reverso do colesterol, célula espumosa e ateroma (Modificado de KWITEROVICH, 2000)

Figura 3 - Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas – Vias: exógena e endógena, oxidação da LDL, transporte reverso do colesterol e transferência de ésteres de colesterol e triglicérides entre as partículas de HDL e β -VLDL (Modificado de KWITEROVICH, 2000)

Figura 4 - Efeitos adversos da homocisteína. GAG, via do glicosaminoglicano-antitrombina III, Proteína C/TM, via anticoagulante da trombomodulina C, TF, fator tecidual, tPa, ativador do plasminogênio tecidual (Modificado de THAMBYRAJAH e col. 2000)

Figura 5 - Molécula de [1- ^{14}C] oleato de colesterol (CE- ^{14}C) utilizado na marcação da LDE

Figura 6 - Molécula de [7(n)- ^3H] colesterol (CL- ^3H) utilizado na marcação da LDE

Figura 7 - Protocolo de estudo da LDE – administração, coletas das amostras de sangue e recebimento dos fragmentos de enxerto vascular

Figura 8 - Curvas de decaimento plasmático do $CE-^{14}C$ e $CL-^3H$ nos pacientes submetidos a revascularização miocárdica (n =9), (média $\pm$ erro padrão da média)

Figura 9 - Captação da LDE em % da radioatividade injetada por grama de tecido nos fragmentos vasculares e pericárdio. 1- radial (n=6), 2 – veia safena (n=7), 3 – torácica interna (n=8), 4 – aorta (n=5) e 5 – pericárdio (n=4), (média $\pm$ erro padrão da média)

Figura 10 - Taxa de esterificação obtida através da razão $CE-^3H / CE-^3H + CL-^3H$, a partir da radioatividade contida nos lípides extraídos dos fragmentos vasculares e pericárdio, (média $\pm$ erro padrão da média)

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Idade e características gerais dos pacientes (média e erro padrão da média)

TABELA 2 - Antecedentes pessoais, familiares e medicação concomitante dos pacientes

TABELA 3 - Perfil lipídico dos pacientes (média e erro padrão da média)

TABELA 4 - Teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, após ANOVA, entre as médias de captação da LDE, trício total, nos fragmentos vasculares e pericárdio em % da radioatividade injetada por grama de tecido

TABELA 5 - Captação da LDE nos fragmentos vasculares e pericárdio em % da radioatividade injetada por grama de tecido (média $\pm$ erro padrão da média)

TABELA 6 - Resultados da genotipagem da apolipoproteína E dos pacientes

RESUMO

COUTO, R.D. CAPTAÇÃO DE UMA EMULSÃO LIPÍDICA SEMELHANTE A LDL POR FRAGMENTOS VASCULARES E PERICÁRDIO DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA. São Paulo, 2002. Dissertação (Mestrado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A doença arterial coronária (DAC) tem sido a maior causa de morte por doenças nos países ocidentais. Existem vários fatores responsáveis pela iniciação e progressão desta doença – fatores ambiental ou genético. Muitos fatores de risco para a DAC estão relacionados a alterações do metabolismo lipídico, como acúmulo de lipoproteína de baixa densidade (LDL) no plasma seguida da deposição da lipoproteína na parede arterial. Recentemente, foi demonstrado que uma emulsão rica em colesterol que se assemelha a composição lipídica da LDL liga-se aos receptores que captam a lipoproteína da circulação e internalizam-na no citoplasma. A emulsão, denominada LDE, é feita sem proteína mas quando injetada na circulação sangüínea adquire várias apolipoproteínas (apo) como apo E que pode ser reconhecida pelo receptor de LDL. A apo E tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B, a apo que liga a LDL nativa ao receptor. No presente estudo, para esclarecer o processo metabólico que a LDL enfrenta no plasma e o processo de captação da lipoproteína pelos vasos, a LDE marcada com colesterol livre-³H (CL) e oleato de colesterol-¹⁴C (CE) foi injetada em 10

pacientes portadores de DAC ($57 \pm 2,2$ anos) submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. Amostras de sangue foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados. A radioatividade presente nas alíquotas de plasma foi determinada por cintilação líquida e a taxa fracional de remoção (TFR) calculada por análise compartimental. Os fragmentos dos enxertos de aorta, artérias radial e torácica interna, veia safena e pericárdio removidos durante o procedimento cirúrgico foram coletados para extração lipídica, separação por cromatografia de camada delgada e quantificação radioativa. A remoção plasmática do CE da LDE foi similar a do CL da LDE ($0,0617 \pm 0,0087$ vs $0,0528 \pm 0,0123$, $p = 0,5635$, respectivamente). A captação do CL da LDE foi maior do que a do CE da LDE na aorta (21% vs 3,1%, $p = 0,0049$), artéria torácica interna (10,3% vs 2%, $p = 0,0007$) e veia safena (8% vs 2%, $p = 0,0326$). Nos fragmentos de artéria radial (14,4% vs 4,3%) e de pericardio (2,2% vs 0,3%), a captação do CL tendeu ser maior do que a captação do CE, porém não foi estatisticamente confirmado. A taxa de esterificação foi maior nos fragmentos de aorta, de torácica interna e de pericárdio do que nos fragmentos de veia safena ($p < 0,001$). Concluindo, a LDE foi captada pelos vasos e pericardio em quantidades consideráveis e a captação do CL pelos tecidos foi maior do que a do CE. Ainda, a taxa de esterificação do colesterol livre foi mais intensa nos fragmentos de aorta e torácica interna do que nos fragments de veia safena.

SUMMARY

COUTO, R.D. UPTAKE OF A CHOLESTEROL-RICH EMULSION RESEMBLING LDL BY VESSEL'S FRAGMENTS AND PERICARDIUM OF PATIENTS UNDERGOING MYOCARDIAL REVASCULARIZATION. São Paulo, 2002. Dissertação (Mestrado).

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Coronary artery disease (CAD) is the main mortality cause in western countries. There are many factors responsible for the onset and progression of the disease – either environmental or genetic. Many risk factors in CAD are related with disorders of lipid metabolism, such as accumulation of low-density lipoprotein (LDL) in the plasma with deposition of the lipoprotein in the arterial wall. Recently, it was shown that a cholesterol-rich emulsion that mimics the lipid composition of LDL binds to the receptors that take-up the lipoprotein from the circulation and internalizes it into the cytoplasm. The emulsion, denominated LDE, is made without protein but when injected into the bloodstream it picks-up several apolipoproteins (apo) such as apo E that can be recognized by the LDL receptor. Apo E has even more affinity for the receptor than apo B, the apo that binds native LDL to the receptors. In the current study, aiming to clarify the metabolic processes that LDL undergoes in the plasma and the process of lipoprotein uptake by the vessels, LDE labeled with ^3H - Cholesterol (CL) and ^{14}C -Cholesteryl Oleate (CE) was injected into 10 CAD patients ($57 \pm 2,2$ yr.) scheduled to be submitted to myocardial

revascularization surgery. Blood samples were collected over 24 hour at pre-established intervals. Radioactivity present in plasma aliquots was determined in a scintillation solution and the fractional clearance rate (FCR) was calculated by compartmental analysis. The graft's fragments of aortic, radial, internal thoracic arteries, safenous vein and pericardium discarded during the surgical procedure were collected for lipid extraction, separation by thin layer chromatography and radioactive counting. The removal from plasma of the LDE CE was similar to that of the LDE CL ($0,0617 \pm 0,0087$ vs $0,0528 \pm 0,0123$, $p = 0,5635$, respectively). The uptake of LDE CL was greater than that of LDE CE in aorta (21% vs 3,1%, $p = 0,0049$), internal toracic artery (10,3% vs 2%, $p = 0,0007$) and safenous vein (8% vs 2%, $p = 0,0326$). In the radial artery (14,4% vs 4,3%) and pericardium (2,2% vs 0,3%) fragments, the CL uptake also tended to be greater than that of CE, but this was not statistically confirmed. The esterification rate was greater in the aorta, internal thoracic artery and pericardium fragments than in safenous vein fragments ($p < 0,001$). In conclusion, LDE was taken-up by vessels and pericardium at considerable amounts and LDE CL uptake by those tissues was greater than that of CE. In addition, the cholesterol esterification rate was more intense in the aorta and internal thoracic artery than in venous fragments.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças vasculares

O endotélio vascular não é uma camada inerte às células sangüíneas como se acreditava nos anos 60 (HUNT, 2000) mas uma interface altamente especializada entre o sangue e os tecidos adjacentes. O endotélio, metabolicamente ativo, apresenta funções diversas como manter o tônus vascular, resistência à formação de trombos e ainda exercer permeabilidade seletiva às células e proteínas. O endotélio está exposto a uma gama de substâncias carregadas pelo sangue que podem tanto alterar suas funções quanto causar comprometimentos vasculares.

As doenças vasculares representam em média a maior causa de morbidade e mortalidade em relação a qualquer outra categoria de doenças (YLA-HERTTUALA e col. 1996; COTRAN e col. 1999). As anormalidades vasculares podem causar eventos clínicos por dois mecanismos principais:

- Estenose, podendo ser por obstrução progressiva completa do lúmen vascular (ex. aterosclerose) ou por evento agudo (ex. trombose), freqüentemente induzindo deficiência no fluxo sangüíneo, diminuindo assim o aporte de sangue aos tecidos perfundidos por esses vasos.

- Enfraquecimento das paredes vasculares, levando a dilatação ou ruptura (ex. aneurisma).

Sendo assim vamos dedicar um pouco de atenção à arquitetura normal das artérias e veias.

1.2 Arquitetura vascular normal

A arquitetura vascular varia e reflete requisitos funcionais distintos às localizações vasculares específicas. Para suportar a pulsação e as altas pressões sangüíneas, as paredes arteriais são geralmente mais espessas do que as das veias. A parede vascular vai diminuindo gradativamente acompanhando a diminuição do calibre dos vasos, porém a relação entre parede vascular e lúmen vascular permanece alta (COTRAN e col. 1999). As veias, por outro lado, possuem maior diâmetro do lúmen e suas paredes são menos espessas.

As artérias são divididas em três tipos, baseados no seu tamanho e características estruturais: (1) artérias grandes ou elásticas (ex. aorta e suas ramificações maiores); (2) médias ou musculares (ex. outras ramificações da aorta, como coronárias e artérias renais) também conhecidas como artérias distribuidoras; e (3) artérias pequenas, freqüentemente menores que 2 mm de diâmetro que se dirigem para dentro do parênquima dos órgãos.

Os constituintes básicos dos vasos sangüíneos são: as células endoteliais, células musculares lisas e matriz extracelular incluindo as substâncias elásticas como colágeno e proteoglicanos (COTRAN e col. 1999). Esses constituintes básicos se encontram distribuídos em camadas concêntricas à íntima (adjacente

ao lúmen), à média e à adventícia (externamente). A quantidade relativa e disposição desses constituintes básicos varia, no decurso do sistema vascular, devido a adaptações mecânicas e necessidades metabólicas locais.

1.3 Células da parede vascular

Em maior parte os componentes celulares da parede vascular dos vasos sanguíneos são: células endoteliais e musculares lisas. Ambas possuem papel importante na patogênese vascular (COTRAN e col. 1999).

1.4 Células endoteliais

As células endoteliais formam uma monocamada que recobre todo o sistema vascular (endotélio). Sua estrutura e integridade funcionais são importantes para a manutenção da hemostasia e função circulatória. As células endoteliais são poligonais, alongadas e possuem várias vesículas pinocitóticas formando ainda complexos juncionais com células vizinhas. Elas unicamente contêm corpos de Weibel-Palade (0,1 μ m de largura por 3 μ m de comprimento) que representam a organela de armazenamento para o fator de Von Willebrand (vWF). As células endoteliais são identificadas imunohistoquimicamente por anticorpos anti-vWF (também conhecidos como antígeno relacionado ao fator VIII) ou outro antígeno endotelial (ex. CD 31). O endotélio vascular é um tecido versátil, multifuncional, que possui tanto propriedades sintéticas quanto metabólicas (HUNT, 2000).

O endotélio é um participante ativo da interação entre o sangue e os tecidos (HUNT, 2000). A lesão endotelial contribui para a formação do trombo, visto que o sub-endotélio é extremamente trombogênico, sendo esse evento crítico para a iniciação da aterosclerose.

1.5 Células musculares lisas

As células musculares lisas ou “smooth muscle cells” (SMC) são capazes de realizar muitas funções, incluindo constrição e dilatação em resposta a estímulos tanto fisiológicos quanto farmacológicos, síntese de colágeno, elastina e proteoglicanos, síntese de fatores de crescimento e citocinas, migração para a camada íntima e proliferação. Sendo o elemento vascular predominante da camada média, as SMC constituem um elemento importante não apenas para o reparo, mas também, relacionadas à patogênese da aterosclerose, por exemplo.

A migração e atividade proliferativa das SMC são fisiologicamente reguladas por regiões promotoras de crescimento e inibição contidas no DNA. Como fatores transcricionais atuantes nestas regiões promotoras podemos citar: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFgF) e a interleucina I. Como inibidores podemos citar: o sulfato de heparan, óxido nítrico, IFN- γ e TGF- β (LIAO, 1998).

1.6 Estenose da íntima e resposta à lesão vascular

A lesão vascular estimula o crescimento das células musculares lisas pelo rompimento do equilíbrio fisiológico existente entre inibição e estimulação. A reconstituição da parede vascular lesada, incluindo o endotélio, envolve uma resposta fisiológica de cicatrização com formação de uma neointima, envolvendo – (1) migração das SMC da camada média para a íntima; (2) subsequente multiplicação das células intimais; e (3) síntese e deposição de matriz extracelular (Figura 1).

Figura 1 – Esquema hipotético de espessamento intimal, células endoteliais, musculares lisas (camada média) e produção de matriz extracelular. (Modificado de: COTRAN e col. 1999).

O processo de cicatrização exagerado causa proliferação intimal com subsequente estenose ou oclusão de vasos sanguíneos de pequenos e médios calibres e também de enxertos vasculares (ex. revascularização do miocárdio). Este cenário contribui para a formação de doenças vasculares clinicamente bem estabelecidas, às quais o estímulo varia predominantemente do mecânico (ex. estenose após angioplastia) e imunológico (ex. aterosclerose do transplante) ao multifatorial (ex. aterosclerose).

As doenças vasculares afetam primeiramente as artérias, sendo a aterosclerose a mais prevalente e de maior importância clínica. A aterosclerose é caracterizada pela formação de lesões intimaes chamadas de ateromas ou placas fibro-gordurosas que se projetam para dentro do lúmen, enfraquecendo a camada média local e evoluindo associada a eventos multifatoriais (COTRAN e col. 1999).

1.7 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença que acomete as artérias e tem geralmente progressão lenta. Ela é caracterizada por placas fibro-gordurosas na camada íntima, formada pela deposição de lípidos, pelo aumento da síntese de matriz extracelular e pelo infiltrado celular. A proliferação das células da musculatura lisa é devida provavelmente à presença de receptores para LDL (LDL-r) nestas células (IKEDA e col. 1994) e receptores para Ox-LDL (LOX-1 - Lectinlike Ox-LDL receptor 1) nas células endoteliais da camada íntima (KATAOKA e col. 1999). Pelo menos cinco tipos celulares participam da formação da placa de ateroma: células endoteliais, macrófagos teciduais (derivados a partir dos monócitos circulantes no

sangue), células T, plaquetas e células musculares lisas (IKEDA e col. 1994). Artérias musculares de grande e médio calibre e elásticas de grande calibre são acometidas pelo processo aterogênico, principalmente as artérias aorta abdominal, coronária, popliteal, aorta torácica descendente, carótidas e o círculo de Willis (em ordem decrescente de frequência). As lesões tendem inicialmente a serem focais, tomando apenas parte da circunferência da luz do vaso e se posicionam de forma bastante irregular em sua extensão (COTRAN e col. 1999).

Na placa aterosclerótica, células musculares lisas e macrófagos da camada íntima da aorta e artérias de grande calibre estão cheias de vacúolos lipídicos, muitos dos quais são constituídos por colesterol e ésteres de colesterol. Essas células têm aparência espumosa (células espumosas) e agregados destas na camada íntima produzem as estrias gordurosas, características do processo aterogênico. A ruptura de estrias gordurosas evoluídas (ateromas), liberando lípidos e fragmentos celulares no espaço intravascular, causa muitas vezes eventos tromboembólicos.

O metabolismo celular do colesterol é especificamente regulado para que as células usem o colesterol na síntese de membranas celulares sem que haja acúmulo intracelular de colesterol e/ou ésteres de colesterol. Acúmulos, entretanto, manifestam-se histologicamente como vacúolos intracelulares e estão implicados em vários processos patológicos, como Inflamação e necrose. As células espumosas são frequentemente encontradas nos sítios de lesão e inflamação celular, devido provavelmente à fagocitose (ou captação pelos receptores scavenger e LOX-1) de colesterol oriundo de membranas de células lesadas, incluindo células parenquimatosas, eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Os

fosfolípidos e as figuras mielínicas são também encontradas no foco inflamatório. Quando em abundância, as células espumosas transformam-se em estrias gordurosas dando uma coloração amarelada ao foco inflamatório (COTRAN e col. 1999).

1.8 Inflamação e aterosclerose

Evidências indicam que a aterosclerose é um processo imunológico envolvendo tanto as células da parede vascular quanto sangüíneas mononucleares, linfócitos T, citocinas e fatores de crescimento (LIBBY e col. 1990; LIAO, 1998). Macrófagos, células T e células da parede vascular, particularmente as SMC, elaboram citocinas e fatores de crescimento que regulam a celularidade e composição da matriz da parede vascular (LIAO, 1998). São várias as hipóteses existentes para justificar a complexidade multifatorial da aterosclerose, como o estresse vascular – hipertensão, infecções por microrganismos (MENDALL e col. 1992), formação de produtos glicosados – diabetes melitus (KRAUSS e col. 1998), homocisteína e aterotrombose (WELCH e col. 1998), fenótipo da apolipoproteína E (ILVESKOSKI e col. 2000).

1.9 Significância clínica

A aterosclerose contribui com aproximadamente mais da metade das mortes por doenças e possui uma alta morbidade nas sociedades industrializadas (YLA-HERTTUALA e col. 1996). Na distribuição global ela já alcança proporções

epidêmicas nas sociedades economicamente desenvolvidas. Apesar do grande impacto da aterosclerose, progressos significativos no tratamento e prevenção vêm sendo alcançados desde a última década nos Estados Unidos da América (EUA) e também em outras sociedades desenvolvidas. Entre 1963 e 1995 houve uma diminuição de aproximadamente 50% nas taxas de morte por doenças isquêmicas do coração e 70% nas mortes por trombose. A redução na mortalidade tem aumentado a expectativa de vida em aproximadamente 5 anos nos EUA. A origem dessa tendência tem sido atribuída a (1) prevenção da aterosclerose a partir de mudanças no estilo de vida, incluindo diminuição do tabagismo, alterações nos hábitos alimentares (com redução no consumo do colesterol e outras gorduras saturadas de origem animal) e controle da hipertensão; (2) avanços nos protocolos terapêuticos do infarto do miocárdio e outras complicações oriundas das doenças isquêmicas do coração; e (3) prevenção da recorrência de eventos clínicos relacionados à aterosclerose em pacientes anteriormente acometidos.

A aterosclerose primeiro afeta as artérias elásticas (ex. aorta, artérias carótidas e ilíacas) e as artérias musculares de grande e médio porte (ex. coronárias e popliteal). A aterosclerose tem início na infância mas os sintomas clínicos, geralmente, tornam-se evidentes a partir da quarta década de vida ou tardiamente quando a lesão existente precipita um evento isquêmico nos órgãos perfundidos. Qualquer artéria em órgão ou tecido do corpo pode ser acometida pelo processo aterosclerótico. A aterosclerose assintomática é mais freqüentemente localizada nas artérias que suprem o fluxo de sangue para o coração, cérebro, rins, extremidades inferiores e intestino delgado.

O Infarto do miocárdio, cerebral e o aneurisma da aorta são as maiores consequências dessa doença. Os dados epidemiológicos obtidos da aterosclerose são expressos em números de casos novos (incidência) ou número de mortes causadas por doença isquêmica do coração. A aterosclerose ainda é responsável por consequências agudas ou crônicas como: gangrena nas pernas, oclusão mesentérica, morte súbita, doença cardíaca isquêmica crônica e encefalopatia isquêmica, por diminuir a perfusão do sangue arterial nos órgãos.

1.10 Doença arterial coronária

A doença arterial coronária (DAC) é uma das causas mais comuns de insuficiência cardíaca e morte na maioria dos países desenvolvidos. Os homens são mais frequentemente acometidos do que as mulheres, porém após a menopausa as mulheres são similarmente acometidas. Nos homens, o pico de incidência das manifestações clínicas ocorre entre os 40-60 anos e nas mulheres entre os 60-70 anos (BISHOP e col. 2000).

1.11 Fatores de risco para a doença arterial coronária

Estudos epidemiológicos têm identificado um grande número de fatores de risco para a doença arterial coronária, tais como uma história familiar positiva (particularmente quando ocorre antes dos 50 anos), idade, atividade ocupacional, anormalidades do perfil lipídico sanguíneo (dislipidemias), hipertensão arterial, inatividade física, tabagismo, diabetes melito, fatores genéticos e

hipoestrogenemia em mulheres menopausadas. As pesquisas mais recentes têm se concentrado nas anormalidades do perfil lipídico, o qual tem um papel importante na fisiopatologia dessa condição clínica. O risco cresce progressivamente com altos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL - low density lipoprotein) e decresce com altos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL – high density lipoprotein). Entretanto, a razão entre LDL-C e HDL-C é um marcador de risco importante, onde razões inferiores a 3 indicam baixo risco e razões acima de 5 indicam alto risco (BISHOP e col. 2000).

Entre os indivíduos com aterosclerose acelerada encontramos níveis elevados de lipoproteína (a) (Lp(a)) e partículas de LDL pequenas e densas. Ainda assim, o problema continua cheio de controvérsias. Evidências acumuladas sugerem a hipertrigliceridemia como fator de risco independente para a doença arterial coronária (KARPE e col. 2001). Níveis elevados de triglicérides freqüentemente ocorrem em associação com outras anormalidades do perfil lipídico, incluindo baixos níveis de HDL-C, altas concentrações de (Lp(a)) e partículas de LDL-C pequenas e densas (BISHOP e col. 1998; GRUNDY, 1998; KREISBERG, 1998; HOWARD, 1999).

1.12 Fisiopatologia da doença arterial coronária

Anormalidade no metabolismo lipídico ou dieta rica em colesterol e ácidos graxos saturados, especificamente quando superpostos a uma predisposição genética, podem ser a ignição inicial necessária para o desenvolvimento do processo aterosclerótico (COTRAN e col. 1999).

As lipoproteínas de baixa densidade LDL são as partículas sabidamente mais aterogênicas até o momento (ASSMANN e col. 1989; KEYS e col. 1970). As lipoproteínas de alta densidade HDL, são protetoras e provavelmente ajudam na mobilização da LDL. O papel de outros lípidos, incluindo os triglicérides na fisiopatologia desse processo, não estão ainda bem esclarecidos. A LDL sofre oxidação *in situ* o que a torna menos mobilizável, por tanto capaz de causar citotoxicidade localizada e ativação das células endoteliais (KATAOKA e col. 1999) e linfócitos T precocemente presentes no foco inflamatório (LIBBY e col. 1991; WITZTUM e col. 1997). Estudos demonstraram que 10% de uma população de células T clonadas a partir de amostras de arterectomia das carótidas, reagem especificamente contra LDL oxidada (Ox-LDL) (STEMME e col. 1995; WITZTUM e col. 1997).

O ponto principal no processo aterosclerótico é a captação de lípidos pelos macrófagos. Os macrófagos migram para o espaço sub-endotelial e captam LDL modificada (SILVA e col. 1995) através dos receptores scavenger (MSR-A, CD36, classe B tipo I e macrosialina / CD68) (KATAOKA e col. 1999), transformando-se em células espumosas (tanto macrófagos quanto células musculares lisas - fibroblastos) (KATAOKA e col. 1999), devido ao acúmulo de lípidos. Com a progressão da placa aterosclerótica, as células da muscular lisa vascular iniciam a sua migração para o sítio da lesão. Nesse estágio a lesão pode ser hemodinamicamente insignificante, mas a função endotelial está seguramente anormal e a sua capacidade de limitar a entrada de lipoproteínas na parede vascular está prejudicada. Se a placa permanecer estável, uma capa fibrosa se

forma, a lesão se torna calcificada e o diâmetro da luz do vaso vai diminuindo gradativamente (COTRAN e col. 1999).

Muitas placas ateroscleróticas permanecem estáveis ou progridem gradualmente, outras rompem com liberação de fragmentos da placa e fatores teciduais que resultam em uma cascata de eventos que culminam muitas vezes em trombose intravascular. O resultado pode ser a oclusão total ou parcial do vaso (causando os sintomas de angina instável ou infarto do miocárdio) ou a placa pode ser reestabilizada freqüentemente seguida de estenose mais acentuada. Vários fatores estão associados com o aumento da vulnerabilidade da placa, incluindo uma grande concentração de macrófagos e presença de capa fibrosa fina (ABRAMS e col. 1996).

1.13 Transporte do colesterol, lípides, lipoproteínas e aterosclerose

A escolha de uma opção terapêutica apropriada para pacientes sob risco de desenvolver doença cardiovascular é de grande importância. Dessa forma, o conhecimento necessário do metabolismo das lipoproteínas plasmáticas e dos lípides que elas transportam como colesterol e triglicérides, torna-se essencial. Como sabemos, o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas é altamente integrado, ou seja, devemos considerar cada lipoproteína e suas subclasses, evitando o que outrora era feito – focalizar apenas uma ou duas lipoproteínas para determinar a escolha terapêutica (KWITEROVICH, 2000).

A lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína (a) (Lp(a)), formam o grupo de lipoproteínas plasmáticas

que possuem apo B-100. Níveis plasmáticos elevados dessas lipoproteínas e seus remanescentes (ex. lipoproteína de densidade intermediária (IDL)), podem promover a aterosclerose (BROWN, 1997) (Figura 2).

Figura 2 – Mecanismo da aterogênese – Lipoproteínas portadoras de apo B-100 - LDL, β-VLDL (remanescentes de VLDL), Lp(a), o HDL no transporte reverso do colesterol, célula espumosa e ateroma (Modificado de KWITEROVICH, 2000).

Quando essas lipoproteínas atravessam a barreira de células endoteliais e penetram na parede vascular podem ser oxidadas e então removidas por macrófagos, que são subseqüentemente transformados em células espumosas (Figura 2). Células endoteliais e espumosas ativadas secretam fatores de crescimento que estimulam a proliferação e migração das células musculares lisas. Esse processo culmina na formação da lesão aterosclerótica.

A apolipoproteína (a), componente da lipoproteína (a), pode promover trombose. Embora existam evidências apontando para a Lp(a) como um fator de risco independente para a DAC estudos recentes não encontraram correlação para suportar estas evidências. Geneticamente determinada, ela interfere na conversão do plasminigênio a plasmina, competindo pelos sítios de ligação de superfície existentes nas células endoteliais. Dessa forma desfaz-se o estado normal anticoagulante da superfície endotelial para a formação de um ambiente pro-coagulante (estímulo à síntese do inibidor do ativador do plasminogênio 1) e pro-aterogênico.

Pesquisas têm demonstrado que o HDL impede a oxidação da LDL e ainda pode transferir o colesterol contido nos macrófagos para o plasma em um processo conhecido como transporte reverso do colesterol.

O colesterol no plasma é basicamente transportado por três classes de lipoproteínas: VLDL, LDL e HDL. O colesterol total é o somatório do colesterol carregado por estas 3 lipoproteínas (após 10-12 horas de jejum). Tanto a VLDL quanto a LDL estão associadas ao processo aterogênico. Por outro lado o HDL-C alto demonstra a funcionalidade do transporte reverso do colesterol pela partícula de HDL, prevenindo a aterogênese. Essas 3 lipoproteínas podem ser separadas e subdivididas em subclasses por vários métodos, por exemplo a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A RMN subdivide as lipoproteínas do plasma nas seguintes subclasses: (1) VLDL, V6-V1, sendo V6 a maior e V1 a menor, (2) IDL, (3) LDL, L3-L1, L1 menor e mais densa, e (4) HDL, H5-H1, sendo H5, H4 e H3 as partículas maiores (FREEDMAN e col. 1998).

As subclasses de VLDL, IDL e LDL, particularmente IDL e L1, estão positivamente correlacionadas com a iniciação e progressão da DAC. As subclasses de HDL, H5, H4 e H3 estão negativamente correlacionadas com a DAC. As subclasses H5, H4 e H3 correspondem ao HDL₂-C e as subclasses H2 e H1 correspondem aproximadamente ao HDL₃-C.

A Lp(a) não pode ser determinada por RMN só apenas por métodos imunoquímicos (FREEDMAN e col. 1998; MARQUINA, e col. 1998). Níveis elevados de Lp(a) promovem aterosclerose devido ao seu conteúdo rico em ésteres de colesterol .

1.14 Transporte do colesterol

1.14.1 Transporte exógeno de lípidos (Dieta) – A gordura da dieta é secretada, após elaboração, pelas células intestinais (enterócitos) em partículas denominadas quilomícrons (QM), um processo que requer a presença de apo B-48. Os triglicérides presentes no centro da partícula são hidrolisados a ácidos graxos e glicerol pela lipoproteína lipase (LPL) endotelial, sendo necessária a presença da apo C-II como cofator, produzindo assim quilomícrons menores denominados remanescentes de quilomícrons. Os remanescentes de quilomícrons são principalmente removidos pelo fígado devido à presença dos receptores da proteína relacionada ao receptor da LDL (LRP) (MAHLEY e col. 1996) (Figura 3).

Quando esses remanescentes aumentam o seu tempo de residência no compartimento plasmático podem promover a aterogênese. Em indivíduos normais os níveis pós prandiais de triglicérides (TG) retornam ao nível basal entre

8-10 horas após uma dieta gordurosa. Por outro lado, pacientes portadores de DAC, apresentam níveis de TG pós prandiais elevados após uma dieta gordurosa devido ao maior tempo de residência das partículas de QM no espaço intravascular (PATSCH e col. 1992). Uma dieta pobre em gordura total e saturada é importante para pacientes portadores de DAC, pois diminuindo a produção de QM e seus remanescentes, evita-se que estas partículas permaneçam por tempo superior ao normal no espaço intravascular.

Figura 3 – Metabolismo das lipoproteínas plasmáticas – Vias: exógena e endógena, oxidação da LDL, transporte reverso do colesterol e transferência de ésteres de colesterol e triglicérides entre as partículas de HDL e β -VLDL (Modificado de KWITEROVICH, 2000).

1.14.2 Transporte endógeno de lípides (Hepático) – As partículas de VLDL, ricas em TG, são sintetizadas e secretadas pelo fígado, um processo dependente de apo B-100 (Figura 3). No plasma, o TG das VLDLs é hidrolisado a ácidos graxos e glicerol (evento semelhante acontece com os QM) sob ação da LPL, na presença do seu cofator a apo C-II. Esse evento resulta na produção de VLDLs menores, chamadas remanescentes de VLDL, como remanescente final origina-se a partícula de IDL. Algumas partículas de IDL são removidas pelos receptores de LDL – receptor B/E, como resultado da interação entre a apo E presente nesta partícula e o receptor presente na superfície hepática, ou o seu conteúdo de TG pode ser hidrolisado, pela lipase hepática (HL), produzindo a partícula de LDL (Figura 3). A LDL é normalmente removida pela interação entre a apo B-100 e o receptor B/E, localizado em vários órgãos e tecidos corpóreos, principalmente no fígado. Porém se a LDL for oxidada ela pode ser removida por vários receptores, como: família do CD 36, SR-A, SR-B1, CD 68 e LOX-1 (RICCIARELLI e col. 2000) presente nas lesões ateroscleróticas em macrófagos e células SMC (formadores das células espumosas), que normalmente (na ausência de estímulos) além destes, expressam o receptor B/E e o LRP (LLORENTE-CORTÉS e col. 2000).

A LDL é normalmente removida pela interação entre a apo B-100 e o receptor B/E, localizado em vários órgãos e tecidos corpóreos, principalmente no fígado. Porém se a LDL for oxidada ela pode ser removida por vários receptores,

como: família do CD 36, SR-A, SR-B1, CD 68 e LOX-1 (RICCIARELLI e col. 2000) presente nas lesões ateroscleróticas em macrófagos e células SMC (formadores das células espumosas), que normalmente (na ausência de estímulos) além destes, expressam o receptor B/E e o LRP (LLORENTE-CORTÉS e col. 2000).

1.15 Fatores genéticos associados

Fatores genéticos múltiplos, incluindo variações em *loci* gênicos, responsáveis pela estrutura e metabolismo das lipoproteínas podem contribuir com a DAC (SALAZAR e col. 2000). Muitas dessas variações têm sido propostas como agravantes do risco para a DAC e algumas têm sido positivamente correlacionadas com alterações no perfil lipídico (GALTON, 1997; SALAZAR e col. 2000).

O gene da apo E tem sido apontado como gene candidato, o qual expressa uma glicoproteína polimórfica (apo E) que possui uma importante influência no metabolismo lipídico (ILVESKOSKI e col. 2000). As três isoformas dessa glicoproteína são designadas E2, E3 e E4, e a herança codominante forma os 6 fenótipos: E2/2, E3/2, E4/2, E3/3, E4/3 e E4/4, sendo o E3/3 o mais comum (UTERMANN e col. 1977).

Vários estudos têm demonstrado que o alelo $\epsilon 4$ da apolipoproteína E (apo E) está associado com um aumento no risco para DAC, entretanto, seu impacto varia com fatores como ocupação, grupo étnico e estilo de vida (DAVIGNON e col.

1988; TIRET e col. 1994; BERCEDO –SANZ, 1999). Em algumas populações com uso de dietas classicamente cardioprotetoras e com uma incidência relativa baixa de doença cardiovascular, as isoformas da apo E4 demonstraram ter influência mínima nas concentrações dos lípides plasmáticos (SALAZAR e col. 2000).

Salazar e col (2000) demonstraram que o polimorfismo *HhaI* do gene da apo E está fortemente associado com a DAC. Resultados então similares aos demonstrados por Galton e col. (1997). Tem sido observado que o genótipo E3/E4 é mais prevalente em pacientes DAC do que nos indivíduos não DAC em várias populações de estudo.

Como o polimorfismo da apo E afeta os níveis de LDL-C e o risco na DAC ele pode também estar relacionado ao desenvolvimento da aterosclerose (ILVESKOSKI e col. 2000). Estudos demonstraram que tanto a aterosclerose quanto a espessura da íntima das artérias carótidas estão relacionados com o genótipo E3/2 e o alelo E4 da apo E (ILVESKOSKI e col. 2000).

O isotipo da apo E adquirida pelas lipoproteínas artificiais e sua biodisponibilidade são extremamente importantes para a endocitose destas partículas por vários tipos celulares (CARPENTIER e col. 1997).

A teoria da aterosclerose causada pela homocisteína, um aminoácido que contém um grupamento sulfidrílico, um intermediário formado durante o catabolismo do aminoácido essencial – metionina - (THAMBYRAJAH e col. 2000), apareceu da observação de doenças homozigóticas como a homocisteinúria, a qual é caracterizada por hiperhomocisteinemia grave ($> 0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$), onde se observa doença vascular prematura (MCKULLY, 1969; MUDD e col. 1995). Valores ligeiramente elevados têm sido observados em mais de 7% da população

(0,015-0,03 mmol.L⁻¹) (THAMBYRAJAH e col. 2000). Evidências epidemiológicas sugerem que uma pequena elevação no nível plasmático da homocisteína é um fator de risco e possivelmente um agente causador da doença aterosclerótica. Podemos citar as seguintes evidências a respeito:

1. Estudos de corte transversal tem demonstrado uma associação entre a homocisteína plasmática e a doença aterosclerótica (GRAHAM e col. 1997).
2. Estudos caso-controle pareados prospectivos demonstram que níveis elevados da homocisteína plasmática precedem o desenvolvimento da doença aterosclerótica (THAMBYRAJAH e col. 2000).
3. O alto valor preditivo para a concentração plasmática da homocisteína como um indicador de mortalidade futura em pacientes com doença arterial coronária estabelecida (NYGARD e col. 1997)

O suporte para a teoria da aterosclerose causada pela homocisteína, vem de experimentos que investigam os possíveis mecanismos em que a homocisteína induz a aterogênese (Figura 4), como:

1. Lesão endotelial,
2. Ativação de plaquetas,
3. Proliferação das SMC,
4. Modificação oxidativa das Lipoproteínas (ex. OX-LDL),
5. Interação endotélio e leucócitos.

Figura 4 – Efeitos adversos da homocisteína. GAG, via do glicosaminoglicano-antitrombina III, Proteína C/TM, via anticoagulante da trombomodulina C, TF, fator tecidual, tPa, ativador do plasminogênio tecidual (Modificado de THAMBYRAJAH e col. 2000).

A deficiência grave da MTHFR causa um aumento nos níveis de homocisteína e está associada a retardos do desenvolvimento mental, anormalidades neurológicas e complicações vasculares (MOTTI e col. 1998). Muitos indivíduos com elevação discreta nos níveis da homocisteína possuem a forma termolábil da MTHFR que tem a sua atividade enzimática defeituosa (KANG e col. 1991). Recentemente foi identificada a substituição de C para T no

nucleotídeo 677 do gene da MTHFR, que converte a alanina ao resíduo de valina, e é responsável pela termolabilidade da enzima (MOTTI e col. 1998). A frequência relativa de homozigotos para a mutação varia de 0,05 a 0,15 entre as populações (MOTULSKY, 1996).

A associação entre o polimorfismo $C^{677} \rightarrow T$ e o risco para doença coronária tem sido descrito por vários autores (KLUIJTMANS e col. 1996; GALLAGHER e col. 1996).

1.16 Lipoproteínas artificiais e suas possibilidades terapêuticas

As lipoproteínas plasmáticas servem como veículo para o transporte de lípidos hidrofóbicos (triglicérides, colesterol e vitaminas), dos sítios de formação para locais de uso e armazenamento (CARPENTIER e col. 1997).

Desde muito o suplemento lipídico tem sido considerado como um meio de prover os tecidos com fontes nutricionais, particularmente em algumas situações especiais. Pouca atenção estava sendo dada ao metabolismo das emulsões lipídicas e aos possíveis outros componentes que podem ser veiculados por elas, além de ácidos graxos e triglicérides.

Avanços recentes indicam o grande potencial do suprimento lipídico para modular funções essenciais do corpo, como influenciar na resposta celular a estímulos, metabolismo intracelular assim como ação de mediadores importantes veiculados por essas partículas. Estas propriedades podem influenciar nas respostas inflamatória, trombótica, microperfusão tecidual e ainda evitar reações

de peroxidação (CARPENTIER e col. 1997). Com o progresso tecnológico recente sobre o metabolismo dessas partículas lipídicas, em futuro próximo, há possibilidade de veicular eficientemente agentes terapêuticos incluídos nestas partículas para tecidos específicos (CARPENTIER e col. 1997).

1.17 Emulsão lipídica artificial (LDE)

A partir do conhecimento adquirido com os estudos das características físico-químicas das lipoproteínas plasmáticas, foram desenvolvidos modelos de emulsões, semelhantes tanto aos QM quanto a LDL, que são utilizadas no estudo do metabolismo das lipoproteínas (GISBURG e col. 1982; MILLER & SMALL, 1983A.; MILLER & SMALL, 1983B).

Em 1993 Raul Maranhão e colaboradores, na Universidade de São Paulo, demonstraram em ratos e seres humanos que a utilização de uma emulsão artificial (LDE), semelhante à porção lipídica da LDL, mas desprovida de apolipoproteínas, apresentava cinética plasmática semelhante à da lipoproteína natural. Quando injetada no compartimento plasmático dos indivíduos, a LDE adquire as apolipoproteínas das lipoproteínas naturais, sendo a mais importante a apo E, que lhe confere a capacidade de ligar-se aos receptores B,E principalmente hepáticos, porém, existentes também em outras células, como vasculares, de órgãos esteroideogênicos e pancreáticas (CNOP e col. 2000). Além disso, experimentos mostraram aumento da captação da LDE marcada com radioisótopos em ratos, quando tratados com 17 α -etinilestradiol, hormônio que

sabidamente aumenta a expressão dos receptores B,E (MARANHÃO e col. 1993). Em seres humanos portadores de patologia em que a expressão dos receptores B,E está aumentada, como a leucemia mielóide aguda (LMA) (HO e col. 1978) ou diminuída, como na hipercolesterolemia familiar forma heterozigótica (GOLDSTEIN & BROWN, 1983), a cinética plasmática da LDE está alterada (ROLAND, 1992; MARANHÃO e col. 1994). Em tese de Doutorado, Roland (1992), citado por SANTOS, 1995, demonstrou que a cinética plasmática da LDE encontrava-se retardada em indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar, quando comparada a indivíduos normais.

Por outro lado, Maranhão e colaboradores (1994) encontraram que em indivíduos portadores de LMA, com a doença ativa, a remoção plasmática da LDE foi significativamente mais rápida quando comparada a indivíduos portadores de leucemia linfóide aguda (LLA). As células da LLA, sabidamente, não têm expressão aumentada dos receptores B,E (CHAIT e col. 1982). Após a remissão da LMA induzida por quimioterapia, as características cinéticas (remoção) da LDE voltaram aos valores normais.

Desta maneira o comportamento da LDE pode servir de ferramenta para avaliarmos o metabolismo da LDL ou provavelmente como veículo para o transporte de drogas devido a sua captação por células neoplásicas (MARANHÃO e col. 1994).

A LDE é produzida em laboratório, de forma prática, em condições estéreis e apirogênicas e a partir de materiais fornecidos pela indústria químico-farmacêutica. Não apresenta os inconvenientes das lipoproteínas naturais, que são isoladas e marcadas por metodologias trabalhosas e que só podem ser

utilizadas de maneira autóloga, devido ao risco da transmissão heteróloga de doenças por via parenteral.

Outra característica importante das emulsões é que se pode variar a sua composição (MARANHÃO e col. 1986) e, desta forma, estudarmos outros aspectos do metabolismo lipídico como a esterificação do colesterol livre, a atividade de proteínas de transferência, o efeito de drogas hipolipemiantes e posteriormente mecanismos de captação vascular.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Durante os últimos trinta anos temos presenciado um declínio razoável da mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto que elevações relativamente rápidas e substanciais têm ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil é um dos representantes. Dessa forma, visamos avaliar cuidadosamente a captação da LDE no tecido vascular e pericárdio de pacientes portadores de doença arterial coronária submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica para que em futuro próximo exista a possibilidade de veicular eficientemente agentes terapêuticos incluídos nesta partícula para tecidos específicos acometidos de processo aterosclerótico. As emulsões lipídicas semelhantes à LDL vêm sendo apontadas como carreadores promissores para drogas utilizadas no tratamento de doenças malignas (VITOLS e col. 1991; LESTAVEL-DELATTRE e col. 1992).

Cumpramos ressaltar que a LDE já vem sendo empregada no transporte de drogas antineoplásicas (MARANHÃO e col. 1994; GRAZIANE e col. 1999), para o tratamento de neoplasias consideradas importantes.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS DO ESTUDO

Avaliar a captação da LDE em fragmentos de enxerto vascular de aorta que normalmente são retirados para o implante das pontes de veia safena, assim como outros fragmentos oriundos das artérias mamária e radial de veia safena e de pericárdio, provenientes de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica.

Determinar a cinética da LDE, a taxa de esterificação do CL captado e o genótipo do apo E.

CASUÍSTICA

4. CASUÍSTICA

4.1 Os pacientes :

Foram avaliados 10 pacientes (Tabelas 1-2) portadores de doença arterial coronária (DAC) submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica no centro cirúrgico do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP).

Foi avaliada a captação da LDE em fragmentos das artérias aorta, torácica interna, radial, da veia safena e do pericárdio, habitualmente retirados durante a revascularização miocárdica. A porcentagem da captação média da LDE nos fragmentos foi comparada entre si e com os fragmentos de enxerto que habitualmente são isentos de aterosclerose (ex. artéria radial).

O DNA foi extraído do sangue periférico para determinação do genótipo para apo E, fator extremamente importante para a interpretação dos dados obtidos a partir do decaimento plasmático e captação da LDE no tecido vascular.

Ressaltamos que essas amostras obtidas já fazem parte do procedimento cirúrgico do paciente, portanto, não foram realizados quaisquer procedimentos adicionais visando obtê-las para estudo.

Esse protocolo de estudo utilizando emulsões artificiais foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina

da Universidade de São Paulo e do Instituto do Coração - InCor e faz parte do Projeto “Lipoproteínas artificiais na investigação das dislipidemias e no tratamento do câncer”, aprovado na sessão **345/99/09**, protocolo de pesquisa **SDC 1517/99/72**.

4.2 Foram selecionados para o estudo indivíduos com os seguintes critérios:

4.2.1 Critérios de inclusão

1. Sexo masculino,
2. Idade entre 40 e 70 anos,
3. Consentimento, após informação, em realizar o estudo,
4. Doença arterial coronária, confirmada por angiocoronariografia,
5. Perfil lipídico entre os valores normais de referência, mesmo em portadores de diabetes melito ou dislipidemia, usando ou não medicação hipolipemiante (ex. vastatinas),
6. Realizar cirurgia de revascularização miocárdica 24 h após administração da LDE.

4.2.2 Critérios de exclusão

1. Indivíduos portadores de disfunção hepática (atividade de protrombina < 50%, ALT e AST > 2x o valor de referência),
2. Indivíduos portadores de disfunção renal (creatinina sérica > 2,0 mg/dl) e ou síndrome nefrótica (proteinúria > 3,0 g/l e albumina sérica < 3,0 g/l),
3. Indivíduos com disfunção tireoideana,
4. Procedimento de revascularização miocárdica sem obtenção de fragmentos (ex. cirurgia a laser).

TABELA 1 - Idade e características gerais dos pacientes – Média $\pm$ erro padrão da média.

Paciente	Nome	Sexo	Idade	Cor	I.M.C
1	IMDJ	M	41	B	31
2	JB	M	58	B	26
3	LCB	M	59	B	32
4	CAMS	M	62	B	26
5	EPG	M	58	N	28
6	TMR	M	50	B	23
7	CAB	M	51	B	27
8	ACSG	M	60	B	30
9	PS	M	65	N	25
10	JDL	M	64	B	29
X$\pm$E.P.			57 $\pm$ 2,2		28 $\pm$ 0,9

I.M.C - índice de massa corpórea; E.P. – erro padrão da média, M – masculino, B – branco, N – negro.

TABELA 2 - Antecedentes pessoais, familiares e medicação concomitante dos pacientes.

Paciente	Antecedentes Pessoais	Antecedentes Familiares	Medicação Concomitante*
JMDT	HAS+FUMO+DISL+AVC+PCR	IAM	Atorvastatina 10mg
JB	HAS+FUMO+DISL+ANG.INST	IAM	Atorvastatina 10mg
LCB	HAS+FUMO+DISL+OBESID	IAM	Atorvastatina 20mg
CAMS	FUMO+DM+IAM com 40 ^a	Pai e Tio falecidos de causa cardíaca (IAM).	Atorvastatina 10mg
EPG	ANG+HAS+DISL+ANG+ICC	HAS	Atorvastatina 10mg
TMR	REOP+HAS+IAM 34 ^a	HAS	Atorvastatina 10mg
CAB	DISL	-----	Atorvastatina 10mg
ACSG	DISL	-----	Atorvastatina 10mg
PS	DM+HAS	DM	-----
JDL	ROP+HAS+DLP+AVC+IAM	-----	Sinvastatina 20 mg

DAC- doença arterial coronária, AVC- acidente vascular cerebral; DM- diabetes melito; ROP- Reoperação de revascularização do miocárdio; HAS- hipertensão arterial sistêmica; DISL – Dislipidemia; IAM – Infarto agudo do miocárdio; OBSID – Obesidade; ANG – Angina; ANG.INST – Angina Instável; ICC – insuficiência cardíaca congestiva, PCR- parada cardio-respiratória, *Obs.: Atorvastatina 10-20 mg ou sinvastatina 20 mg, V.O. 1 Comprimido / dia, por 3 a 4 semanas em média.

MATERIAL E MÉTODOS

5. Material e Métodos

5.1 Materiais Utilizados:

Os isótopos radioativos $[1-^{14}\text{C}]$ oleato de colesterol ($\text{CE-}^{14}\text{C}$) e o $[7(n)-^3\text{H}]$ colesterol ($\text{CL-}^3\text{H}$) (Figuras 5 e 6) foram obtidos da Amersham International (Little Chalfont, Inglaterra). Os lipídeos trioleína, oleato de colesterol, colesterol e fosfatidilcolina, utilizados para a o preparo da emulsão foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, USA). A pureza dos lipídeos foi avaliada pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) (0,5 mm de espessura), utilizando sílica gel 60 H e sistema solvente de hexano: éter etílico: ácido acético (70: 30: 1) v/v.

Figura 5- Molécula de $[1-^{14}\text{C}]$ oleato de colesterol ($\text{CE-}^{14}\text{C}$) utilizado na marcação da LDE

Figura 6 – Molécula de [7(n)- ^3H] colesterol (CL- ^3H) utilizado na marcação da LDE.

Os demais reativos e solventes foram adquiridos da Merck-Quimitra (Rio de Janeiro, Brasil) sendo que, para a análise molecular, os reagentes (primers, enzimas de restrição, DNTps, Taq-Polimerase e tampão) foram adquiridos na Amersham Pharmacia Biotech e GibcoBRL – Life Thecnologies do Brasil.

5.2 Esterilização do material

Toda vidraria utilizada neste estudo foi submetida à esterilização e despirogenização a seco (estufa 180 °C, por 90 min.) e a vapor (autoclavagem a 120 °C, 1,5 atm., 30 min.). O material plástico e de borracha foi submetido à esterilização por exposição à luz ultravioleta, comprimento de onda de 253,7 nanômetros, por 12h. Todo o procedimento de preparo das emulsões foi realizado em capela de fluxo laminar vertical. Alíquotas das emulsões artificiais foram submetidas a teste de presença de pirogênicos e esterilidade, no laboratório de

metabolismo de lípidos do InCor e no setor de Bacteriologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, respectivamente.

5.3 Preparação da LDE marcada com CE-¹⁴C e CL-³H

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por GISNBURG e cols. (1982). Em um frasco foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, a partir de estoques preparados em clorofórmio / metanol (2:1). Foram adicionados 70 kBq de CE-¹⁴C (oleato de colesterol) e 121 kBq de CL-³H (colesterol). A seguir a mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio e mantidas em dessecador a vácuo, por 16 h, a 4°C, para a remoção dos solventes residuais. Após a adição de 10 ml de tampão tris-HCl 0,01 M, pH 8 a mistura de lipídeos foi então emulsificada por irradiação ultra-sônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-som, São Paulo, Brasil) potência 125 watts, durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 e 55°C. Em seguida a emulsão foi centrifugada a 200.000 x g por 30 minutos, a 4°C (ultracentrífuga Sorval, rotor Beckman SW-51). Cerca de 10% da parte superior do tubo contendo partículas maiores do que o desejado, foi desprezada. Foi adicionado brometo de potássio (KBr) ao restante do material, para ajustar sua densidade para 1,21g/ml e o material foi submetido a uma nova centrifugação, por 2 horas, a 4°C, 200.000 x g, com o mesmo rotor. Nestas condições, a LDE foi recuperada no topo do tubo (cerca de 20% do total).

O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão tris-HCl 0,01M, pH 8, e finalmente esterilizada, por filtração em membrana Millipore (0,22 μ de porosidade), e armazenada a 4°C por até trinta dias.

5.4 Protocolo de estudo

No nosso protocolo de estudo (Figura 7) avaliamos a cinética da LDE marcada com ^3H -Colesterol (CL- ^3H) e ^{14}C -Oleato de Colesterol (CE- ^{14}C), a sua captação em fragmentos vasculares e fatores genéticos associados que predispõem à DAC, em 10 pacientes portadores de DAC, submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica. Os pacientes foram submetidos ao protocolo de infusão endovenosa da LDE, sendo os fragmentos das artérias aorta, torácica interna e radial, de veia safena e de pericárdio obtidos durante o procedimento cirúrgico 24 horas após administração da LDE.

Figura 7 : Protocolo de estudo da LDE – administração, coletas das amostras de sangue e recebimento dos fragmentos de enxerto vascular.

5.5 Determinações laboratoriais

Foram determinadas, antes da administração da LDE nos pacientes, as concentrações de colesterol total (CT), suas frações e triglicérides (TG), em amostras de soro obtidas após 12 – 14 horas de jejum, pelos métodos de SIEDEL e cols. (1981). O HDL colesterol (HDL-C) foi determinado pelo mesmo método usado para o CT, após a precipitação das VLDL e LDL pelo método de BURNSTEIN e cols. (1970). As concentrações do colesterol de VLDL e LDL foram calculadas pela fórmula de FRIEDEWALD (1972), para valores de TG até 400 mg/dL.

5.6 Determinação da cinética da remoção da LDE

Os estudos do comportamento cinético da LDE foram realizados em tempos pré-determinados durante as 24 h do protocolo de pesquisa. Inicialmente, os pacientes encontravam-se em dieta leve, pré-operatório, mas no decorrer do protocolo de estudo foram permitidas refeições a critério médico.

Antes do procedimento foram canuladas duas veias, de membros superiores diferentes, com cateter “butterfly “ tamanho 21 e mantidas com fluxo contínuo de solução fisiológica. Foram então injetados cerca de 200 μ L de LDE num dos braços, correspondente a 75 kBq de CE- 14 C e 182 kBq de CL- 3 H.

A primeira amostra foi colhida da veia do membro superior contralateral 5 minutos após a administração da LDE. Posteriormente foi utilizado o acesso

venoso de maior facilidade para a realização das coletas subseqüentes, nos períodos: 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. As amostras foram colhidas em tubos de ensaio contendo heparina (50 U.I./mL). Após a coleta o plasma foi separado por centrifugação e processado imediatamente. Para avaliação da remoção plasmática da LDE foi medida a radioatividade presente em alíquotas de 1,0 mL de plasma em cada um dos tempos de coleta por cintilação líquida. Foram traçadas as curvas de remoção plasmática dos lípides radioativos e calculadas as taxas fracionais de remoção (TFR) (MATTHEWS, 1957) dos mesmos, através da análise compartimental, com a utilização de um programa computacional desenvolvido para análise de cinética de emulsões artificiais (MESQUITA, 1994).

A cinética de remoção plasmática da LDE foi determinada através de avaliações isoladas das remoções plasmáticas de seus componentes lipídicos radioativos, devido aos mesmos apresentarem cinéticas diferentes. O colesterol não esterificado tem um comportamento dinâmico, difusível entre o plasma e as lipoproteínas. O oleato de colesterol permanece no interior da partícula até a sua captação.

5.7 Análise da cinética dos lípides marcados: oleato de colesterol marcado com ^{14}C (CE- ^{14}C) e colesterol livre marcado com ^3H (CL- ^3H) :

A curva de remoção plasmática do ^{14}C -colesterol esterificado (CE- ^{14}C) reflete a cinética de remoção da LDE apresentando um perfil biexponencial com um rápido decaimento inicial seguido de um decaimento mais lento. Esse perfil levou à adoção de um modelo com dois compartimentos, sendo dois pools (pools 1 e 2) intravasculares no compartimento 1 e um pool (pool 3) extravascular no compartimento 2, assumindo um sistema em constante equilíbrio (MARANHÃO e col. 1993). Os lípides marcados da LDE no espaço intravascular, tal como foi injetada (compartimento 1), sendo logo em seguida removida por receptores presentes no endotélio vascular e/ou espaços extravasculares (compartimento 2).

A partir do método dos mínimos quadrados não lineares foram calculadas as taxas fracionais de transferência (k) dos lípides marcados entre os compartimentos (MATTHEWS, 1957).

Os compartimentos e as taxas fracionais de transferência (k) adotados neste estudo foram definidos como:

- Depois da administrada endovenosamente no pool 1, decorrido tempo suficiente, uma fração deste pool ($k_{1,3}$), migrar para o pool 3, enquanto outra fração ($k_{1,2}$) é transferida para o pool 2. Uma fração do pool 2 ($k_{2,3}$) também migra para o pool 3 (MARANHÃO e col. 1993).
- As taxas de transferência k_{12} , k_{13} e k_{23} foram estimadas usando-se os métodos dos mínimos quadrados não lineares (BEVINGTON, 1969; DRAPER e col. 1966; MARANHÃO e col. 1993).

Para representar a remoção das partículas foram utilizados os parâmetros denominados taxas fracionais de remoção (TFR), em h^{-1} , dos lípides marcados, estimados segundo MATTHEWS, (1957) utilizando-se as respectivas taxas fracionais de transferência (k)

$$TFR = (k_{1,2} + k_{1,3}) \cdot k_{2,3} / k_{1,2} + k_{2,3}$$

5.8 Cálculo da taxa fracional de remoção - oleato de colesterol- ^{14}C e do colesterol- 3H

As taxas fracionais de remoção (TFR) do CE- ^{14}C e do CL- 3H foram determinadas por análise compartimental, utilizando-se o programa Anacomp versão 3.11 (MESQUITA, 1994), através da seguinte equação (MATTHEWS, 1957):

$$TFR = \left(\frac{a_1}{b_1} + \frac{a_2}{b_2} \right)^{-1}$$

Onde a_1 , b_1 , a_2 , b_2 foram estimados a partir de curvas biexponenciais, obtidas da radioatividade restante no plasma após a injeção e ajustadas pelo procedimento dos mínimos quadrados como:

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

Onde (y) representa o decaimento da radioatividade plasmática e (t) o tempo.

5.9 Procedimento cirúrgico e obtenção dos fragmentos

Os pacientes foram submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica de acordo com procedimentos de rotina. Foi avaliada a captação da LDE nos fragmentos que habitualmente são retirados sempre que indicado.

A tática cirúrgica foi a de rotina no Instituto do Coração – InCor, ou seja: preparo do paciente com monitorização contínua de sua pressão arterial média, pressão venosa central, diurese e eletrocardiograma. Após anestesia geral os enxertos foram obtidos, quando necessário, pela retirada de segmentos da veia safena magna de um ou ambos membros inferiores, pela dissecação de uma ou ambas artérias torácicas internas, quando indicado, pela dissecação das artérias: gastroepiplóica direita, radial e epigástrica inferior.

A cirurgia habitualmente é realizada com o auxílio da circulação extracorpórea e parada cardíaca.

Após a realização dos enxertos e recuperação dos batimentos cardíacos, a circulação extracorpórea é interrompida e inicia-se o processo de fechamento torácico e dos demais locais incisados para obtenção dos enxertos. Ao final do procedimento o paciente é enviado, ainda sob assistência ventilatória, à unidade de recuperação pós-operatória onde deverá permanecer até que tenha condições hemodinâmicas e gerais para que retorne ao leito de origem.

Os pacientes receberam alta hospitalar após 7 ou 8 dias de acordo com sua condição geral.

5.10 Extração de lípides

Após a obtenção dos fragmentos estes foram colocados imediatamente em solução fisiológica gelada e limpos em condições adequadas sobre placa de gelo. Em seguida os fragmentos foram pesados, anotados seus pesos exatos em miligramas (mg) e então picotados de forma que ficassem com aspecto pastoso.

Os fragmentos, já com aspecto pastoso, foram submetidos à extração de lípides pelo método de FOLCH, 1957, ou seja, transferidos para tubos grandes (20X160), adicionados 10 mL de metanol e 20 mL de clorofórmio e deixados em repouso “overnight” (cerca de 18 horas) a 4°C. As amostras foram filtradas em papel de filtro por gravidade; em seguida o filtrado foi lavado com 2,5 mL de clorofórmio por duas vezes; adicionados 7 mL de água bidestilada aos tubos, que foram tampados com “Parafilm” (evitando agitar) e deixados mais uma vez em repouso, “overnight”. Após o repouso a fase sobrenadante foi aspirada a vácuo e então descartada. Adicionamos 4 mL de “Clear folch” CHCl_3 / MeOH / H_2O na proporção de 3:48:47; deixados mais uma vez em repouso “overnight” à temperatura ambiente. Após o repouso foram aspiradas e descartadas as fases sobrenadantes. Em seguida as amostras foram secas sob fluxo contínuo de nitrogênio (N_2), dissolvidas em solução de FOLCH e transferidas para tubos menores, lavando várias vezes, agitando-se bem o tubo de extração e então, mais uma vez seca sob fluxo de nitrogênio e reconstituída em 150 μL de solução de FOLCH em gelo. Foram aplicadas 100 μL em placa de sílicagel 60H (Sigma S - 6628) para desenvolvimento da cromatografia de camada delgada (CCD). As

aplicações foram feitas em bandas com cerca de 5,0 cm de largura. Após secas, as placas foram colocadas em cuba cromatográfica para correr a cromatografia usando o seguinte sistema de fase: hexano/ éter etílico/ ác. acético na proporção de 70:30:1; por cerca de 40 minutos, logo após a CCD as placas foram secas à temperatura ambiente. Finalmente as placas foram reveladas com iodo sublimado, demonstrando as áreas das bandas referentes às frações lipídicas a serem delineadas; sendo então raspadas as bandas da placa para “counting vials” e adicionadas 7 mL de solução cintiladora PPO/POPOP/ Triton X-100/ tolueno (5,0 g/ 0,5g/ 333 mL/667 mL). Medimos então a radioatividade em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, 1600^{TR} Tri-Carb, PACKARD), sob utilização do software SpeedSTAR Plus Vers. 5.01 da Diamond Computers, para determinação das contagens de colesterol-³H e oleato de colesterol-¹⁴C das amostras.

5.11 Geração do éster de colesterol-³H a partir do colesterol livre-³H

A avaliação da esterificação do CL-³H a CE-³H foi feita após extração lipídica dos fragmentos de enxerto vascular em metanol: clorofórmio: H₂O (12,5: 25: 12,5) v/v, por uma noite, a 4°C (FOLCH e col. 1957). A fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica seca sob fluxo de nitrogênio, em banho-maria a 37°C. Os lípides foram ressuspensos em 5 mL de solução de FOLCH (clorofórmio: metanol, 2:1), e novamente secos sob fluxo de nitrogênio e, finalmente, ressuspensos em 150 µL de solução de FOLCH e submetidos à separação por cromatografia em camada delgada (CCD), como descrito acima. A placa foi

revelada por exposição ao vapor de iodo e as bandas correspondentes ao éster de colesterol e ao colesterol livre foram raspadas e transferidas para frascos de contagem, contendo a solução cintiladora PPO/ POPOP/ Triton X-100/ tolueno (5,0 g/ 0,5g/ 333 mL/667 mL). A radioatividade de cada fração foi medida no contador beta Packard Tri-Carb 1600TR nas bandas (janelas) do ^3H e ^{14}C .

5.12 Avaliação do processo de esterificação do colesterol livre-³H a éster de colesterol-³H

O processo de esterificação do CL foi avaliado a partir da razão ($CE\text{-}^3H / CL\text{-}^3H + CE\text{-}^3H$) das radiações provenientes do $CL\text{-}^3H$ e $CE\text{-}^3H$, a partir da separação dos lípides totais em CCD, extraídos dos fragmentos de enxerto. A taxa média de esterificação gerada foi comparada entre os fragmentos por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa GraphPad InStat TM versão 2.01 (GraphPad Software, Universidade de São Paulo, 930675S).

5.13 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 10 mL de sangue periférico coletados em tubo contendo EDTA (10%, 0,1 mL). O sangue total foi transferido para um tubo de 50,00 mL, onde foram adicionados 10,00 mL de tampão A. Para homogeneização, deixamos a 4°C durante 10 minutos e logo em seguida, centrifugamos a 3000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C. Na etapa de lavagem, após descartar o sobrenadante, adicionamos 20,00 mL de tampão A, ressuspendemos o sedimento leucocitário através de agitação e deixamos a 4°C por 10 minutos. Após este intervalo de tempo centrifugamos a 1.500 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.

Para a lise, descartamos o sobrenadante, ressuspendemos o sedimento leucocitário em 3,00 mL de tampão B, 200 μ L de SDS 10%, adicionamos a 500 μ L de tampão C com proteinase K (2 μ L de proteinase K - 20 mg/mL, diluída em 5,00 mL de tampão C), e deixamos a 37°C por 24 horas.

O DNA genômico foi precipitado adicionando-se 1,00 mL de solução D (NaCl 6M) misturando vigorosamente por 1min, em seguida centrifugamos a 3000 r.p.m. por 20 min. a 4°C. Transferimos o sobrenadante para um tubo de 15,00 mL, adicionamos um volume de etanol 100% (mantido a -20°C) e agitamos o tubo vagarosamente até visualizar o DNA precipitado. O DNA precipitado foi então pescado utilizando uma micropipeta e transferido para tubo de "eppendorf" contendo 1,00 mL de etanol 70% (mantido a -20°C).

Para a etapa final da extração centrifugamos a 13.000 r.p.m. por 30 min. a 4°C, descartamos o sobrenadante, secamos bem o tubo por inversão e então ressuspendemos o sedimento (DNA) em TE 1X.

Após a completa dissolução, diluímos o DNA 50 X em TE 1X, para ler a densidade ótica (D.O.) em 260nm.

Ex. 20 mL de DNA + 980 mL de TE 1X. Após a leitura a 260 nm: $0,300 \times 50$ (Fd) $\times 50$ (coef. de extinção do DNA) = 750 ng/mL.

Obs.: Para a reação da PCR, acertamos a concentração do DNA para 100 ng/mL.

5.14 Amplificação das seqüências gênicas de apo E a partir do DNA genômico

O DNA foi amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase ou “Polimerase Chain Reaction” (PCR) segundo a técnica descrita por Hixson e colaboradores (1990), no termoclicador “Termociclador GeneAmp 2400 PCR System” (Perkin Elmer) usando os seguintes primers: 5'-ACAGATTGCGCCCGGCCTGGTACAC-3' e 5'-TAAGCTTGGCAGGCTGTCCAAAGGA-3'. Cada reação conteve além dos primers (1pmol/ μ l), DMSO 10%, nucleotídeos, tampão, 0.025U/ μ l de “Taq polymerase” e 1 μ g de DNA genômico. Cada mistura (MIX) foi submetida aos seguintes esquemas de temperatura: 95°C por 3 min (desnaturação), 35 ciclos a 57°C por 30 segundos (“annealing”, ligação dos primers), 72°C por 1 min (extensão) e 95°C por 1 min (desnaturação), extensão final a 72° C por 7 minutos. O produto do PCR foi visualizado em gel de agarose a 1%, sob luz ultravioleta. Como controle negativo usamos um MIX, para cada reação, contendo todos os reagentes exceto DNA, amplificado junto com as reações teste para garantir que não houve contaminações.

5.15 Digestão com a Enzima de Restrição HhaI

Adicionamos 05 unidades de *HhaI* ao produto de PCR, deixamos a 37°C por tempo superior à 03h. O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 %, sob corrente constante de 45 mA por 3 h. Após incubar o gel por 10 min em brometo de etídio os fragmentos foram visualizados por iluminação ultravioleta (UV). Os tamanhos dos fragmentos foram comparados com marcadores moleculares de tamanhos conhecidos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

6. Análise Estatística

6.1 Teste t

O teste t bicaudal foi utilizado para analisar as diferenças entre as médias e desvios dos resultados da TFR dos lípides radioativos, para a comparação entre a captação de colesterol livre e éster de colesterol, nos fragmentos de enxerto vascular e pericárdio.

6.2 Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer

A análise de variância seguida do teste de Tukey-Kramer foi utilizada para comparar a diferença entre as médias e desvios da captação de colesterol triciado e éster de colesterol marcado com carbono quatorze isoladamente e ainda para comparar a taxa de esterificação tecidual do $CL-^3H$ ($CL \rightarrow CE$) entre os fragmentos de tecido vascular e pericárdio.

6.3 Teste de correlação linear

O coeficiente de correlação linear Spearman foi aplicado para avaliar a correlação entre o decaimento plasmático da LDE, do genótipo para apo E e da radioatividade recuperada da captação da LDE nos fragmentos vasculares e pericárdio utilizado-se o software GraphPad InstatTM.

Em todas as análises efetuadas, os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes quando obtivemos P bicaudal $< 0,05$ para um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1 Lípidos plasmáticos

A tabela 3 mostra os dados de concentração plasmática de colesterol total (CT), HDL, VLDL, LDL e de TG (em mg/dL) determinados nos pacientes submetidos a revascularização miocárdica. A concentração de lípidos plasmática foi determinada para excluir pacientes, que embora sob farmacoterapia, pudessem apresentar alterações no perfil lipídico. Não houve alteração importante no perfil lipídico dos pacientes (tabela 3).

TABELA 3 - Perfil lipídico dos pacientes (média e erro padrão da média)

Perfil Lipídico*	Média ± E.P.
CT	201 ± 9
HDL-C	39 ± 3
VLDL-C	40 ± 7
LDL-C	118 ± 17
TG	198 ± 37

*mg/dL, sob efeito de vastatinas. CT – colesterol total, HDL-C – colesterol de HDL, VLDL-C – colesterol de VLDL, LDL-C – colesterol de LDL, TG – triglicérides.

7.2 Estudos cinéticos da LDE

A figura 8 mostra as curvas de decaimento plasmático dos lípides radioativos da LDE. Nota-se que, embora a curva média do colesterol livre mostre um decaimento discretamente mais lento que a do éster de colesterol, há superposição de valores indicando que a curva de decaimento do CL foi semelhante à do CE ($p = 0,5635$, Teste t).

Figura 8 – Curvas de decaimento plasmático do CE-¹⁴C e CL-³H nos pacientes submetidos a revascularização miocárdica (n =9), (média $\pm$ erro padrão da média).

7.3 Captação da LDE

A figura 9 mostra a captação da LDE nos fragmentos de enxerto vascular e pericárdio expressa em % da radioatividade injetada por grama de tecido. A captação do CL-³H somado à fração esterificada (colesterol triciado), foi maior na aorta quando comparada ao fragmento de torácica interna, de veia safena e de pericárdio (ANOVA, $p=0,0013$). Embora a aorta tenha captado cerca de 1,4 vez mais colesterol triciado, não houve diferença em relação ao fragmento de radial. A tabela 4 mostra o resultado da comparação múltipla de Tukey-Kramer entre os dados de captação do colesterol triciado nos fragmentos vasculares e pericárdio. Nota-se que houve diferença de captação do colesterol triciado entre os fragmentos ($p<0,05$, ANOVA). A tabela 5 mostra que a captação média do colesterol triciado total foi maior que a captação média do éster de colesterol-¹⁴C na aorta, na torácica interna e na veia safena, demonstrando tendência para o mesmo comportamento na radial e no pericárdio.

Figura 9 - Captação da LDE em % da radioatividade injetada por grama de tecido nos fragmentos vasculares e pericárdio. 1- radial (n=6), 2 – veia safena (n=7), 3 – torácica interna (n=8), 4 – aorta (n=5) e 5 – pericárdio (n=4) (média $\pm$ erro padrão da média).

TABELA 4 - Teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, após ANOVA, entre as médias de captação da LDE, trício total, nos fragmentos vasculares e pericárdio em % da radioatividade injetada por grama de tecido.

Comparações*	q	P
radial vs. aorta	2.441	NS
radial vs. torácica interna	1.734	NS
radial vs. veia safena	2.854	NS
radial vs. pericárdio	4.317	p<0,05
aorta vs. torácica interna	4.235	p<0,05
aorta vs. veia safena	5.227	p<0,01
aorta vs. pericárdio	6.357	p<0,01
torácica interna vs. veia safena	1.249	NS
torácica interna vs. pericárdio	3.021	NS
veia safena vs pericárdio	1.921	NS

*Houve diferença entre a captação do colesterol livre triciado somado à fração esterificada nos fragmentos de tecido destacados em negrito (p=0,0013, ANOVA).

TABELA 5 - Captação da LDE nos fragmentos vasculares e pericárdio em % da radioatividade injetada por grama de tecido – média $\pm$ erro padrão da média.

Tecido Vascular		CL- ³ H + CE- ³ H	CE- ¹⁴ C	P
radial	(n=6)	0,144 $\pm$ 0,040	0,043 $\pm$ 0,020	0,0585
aorta	(n=5)	0,209 $\pm$ 0,030	0,031 $\pm$ 0,010	0,0049
torácica interna	(n=8)	0,103 $\pm$ 0,015	0,018 $\pm$ 0,005	0,0007
veia safena	(n=7)	0,075 $\pm$ 0,020	0,017 $\pm$ 0,010	0,0326
pericárdio	(n=4)	0,022 $\pm$ 0,006	0,003 $\pm$ 0,001	0,0523

7.4 Esterificação do Colesterol - $CL-^3H$ a $CE-^3H$

A figura 10 mostra a taxa de esterificação do $CL-^3H$ a $CE-^3H$ obtida através da razão $CE-^3H / CE-^3H + CL-^3H$, a partir dos lípides radioativos extraídos dos fragmentos vasculares e pericárdio. Houve diferença entre as médias da taxa de esterificação nos fragmentos de enxerto vascular e pericárdio.

Figura 10 - Taxa de esterificação obtida através da razão $CE-^3H / CE-^3H + CL-^3H$, a partir da radioatividade contida nos lípides extraídos dos fragmentos vasculares e pericárdio (média $\pm$ erro padrão).

A taxa de esterificação foi significativamente diferente nas artérias aorta, torácica interna, radial e no pericárdio quando comparadas à veia safena ($p < 0,001$, ANOVA). A taxa de esterificação foi semelhante entre a aorta, a artéria torácica interna e o pericárdio ($p > 0,05$, ANOVA), porém nota-se na figura 10 que, em relação à análise dos desvios, o fenômeno de esterificação na aorta foi mais homogêneo, ou seja, mais reprodutivo do que nos fragmentos de artéria torácica interna, radial, veia safena e de pericárdio.

7.5 Genotipagem da apolipoproteína E

A tabela 6 mostra a frequência do isótipo da apo E nos pacientes participantes do estudo. A frequência dos isótipos encontrada foi de 67%, apo E - 3/3 e 33%, apo E - 4/3.

TABELA 6 - Resultados da genotipagem da apolipoproteína E dos pacientes.

Pacientes	Fenótipo apo E
IMDJ	3/3
JB	3/3
LCB	3/3
CAMS	3/3
EPG	4/3
TMR	3/3
CAB	3/3
ACSG	4/3
PS	4/3
JDL	*

*não realizado.

7.6 Estudo de Correlação

Não houve correlação linear entre os resultados de genotipagem da apolipoproteína E, de captação da LDE e de esterificação do colesterol livre a éster de colesterol nos fragmentos de tecido, não demonstrou correlação linear. Também não houve correlação linear entre as TFR da LDE com o CL-³H ($r = 0,2453$, $p = 0,9999$) e CE-¹⁴C ($r = 0,3536$, $p = 0,5167$), captados nos fragmentos vasculares e no pericárdio.

DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

É de fundamental importância a validação de uma metodologia capaz de determinar a captação de emulsões artificiais por tecidos, particularmente, se utilizada para entender mecanismos de doenças relacionadas com a captação do colesterol, como por exemplo à aterosclerose. Não foram observadas alterações importantes no perfil lipídico dos pacientes. As alterações no perfil lipídico poderiam influenciar a cinética de remoção plasmática da LDE. ROLAND (1992) demonstrou que a cinética plasmática da LDE encontrava-se diminuída em portadores de hipercolesterolemia familiar quando comparada à de indivíduos normais.

O decaimento plasmático do CL foi semelhante ao do CE nos pacientes com doença arterial coronária, ou seja, não houve diferença na remoção plasmática dos lípidos radioativos. Embora não tenha sido objeto do nosso estudo, nove dos 10 pacientes encontravam-se sob efeito de inibidores da 3-hidróxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMGCoA redutase). SANTOS (1995) demonstrou que a sinvastatina reduziu significativamente a concentração plasmática de LDL-colesterol e não aumentou a remoção plasmática da LDE. Sendo assim, nossos dados de cinética e captação não sofreram influências dos inibidores da HMGCoA redutase.

A recuperação dos lípides radioativos CL-³H e CE-¹⁴C da LDE nos fragmentos vasculares e de pericárdio comprovam que realmente houve captação tecidual da LDE. Em estudos anteriores de captação da LDE realizados por nosso grupo de pesquisa utilizando 10 camundongos divididos em dois grupos de cinco animais (grupo I - administração intraperitoneal e no grupo II - administração no plexo intra-ocular), houve captação da LDE por fragmentos de tecido vascular, muscular, fígado, baço, pulmão e cérebro validando o método de estudo (dados não publicados).

Houve captação mais intensa do CL-³H somado à fração esterificada (colesterol triciado) na aorta quando comparada aos fragmentos de artéria torácica interna e de pericárdio. A captação do colesterol triciado foi mais intensa do que a captação do éster de colesterol-¹⁴C nos fragmentos de tecido vascular e pericárdio. Como a captação do éster de colesterol indica a remoção da partícula de LDE, e houve maior captação de colesterol livre, o CL pode ter sido captado independente da remoção final da LDE, provavelmente, devido as suas características peculiares como capacidade de difundir-se dinamicamente das lipoproteínas para o plasma e tecidos ou vice-versa.

Embora tenha havido maior recuperação de CL-³H nos fragmentos, o acúmulo de ésteres de colesterol durante a indução da aterosclerose é um processo bem estabelecido. Acredita-se que dois grandes processos - infiltração dos ésteres de colesterol e sua síntese local - estejam envolvidos. Estudos *In vivo* em coelhos com dieta hipercolesterolemica sugeriram que o plasma é a principal fonte de colesterol livre e esterificado recuperados na aorta desses animais (BRECHER & CHOBANIAN, 1974).

A taxa de esterificação do colesterol livre a éster de colesterol foi significativamente diferente nas artérias e no pericárdio quando comparados à veia safena. Provavelmente por serem as veias menos susceptíveis a aterogênese, comportam-se diferentemente das artérias. Vários estudos *in vitro* em segmentos arteriais intactos têm demonstrado que os segmentos ateroscleróticos esterificam o colesterol livre mais rápido do que artérias não acometidas, fato documentado em segmentos arteriais de coelhos, macacos e seres humanos (BRECHER & CHOBANIAN, 1974).

A taxa de esterificação do CL foi semelhante na aorta, torácica interna e no pericárdio, diferindo na artéria radial e na veia safena. A artéria radial e a torácica interna são consideradas bons enxertos para utilização durante a revascularização miocárdica por serem menos acometidas pela aterogênese. Observa-se que a médio e longo prazo a torácica interna sofre menos re-obstruções quando comparada aos fragmentos de enxerto comumente utilizados, devido a este fato a artéria torácica interna tem sido o enxerto de preferência durante a cirurgia de revascularização miocárdica. Provavelmente a esterificação não seja o fator determinante dos eventos obstrutivos, porém quando associada a características hemodinâmicas favoráveis, pode colaborar com esses eventos.

Por não ter estudado a taxa de esterificação plasmática do CL-³H da LDE, não podemos afirmar que o CE-³H recuperado nos fragmentos vasculares tenha sido esterificado pela ACAT presente na parede vascular. Por outro lado, as células da parede vascular poderiam ter captado o CE-³H no plasma, ou ainda o CE-³H captado poderia ser hidrolisado por hidrolases citoplasmáticas neutras, gerando o CL-³H que então no “pool” de colesterol livre intracelular seria

novamente esterificado pela ACAT. O processo de esterificação do colesterol é bastante complexo pois interliga tanto eventos que ocorrem no plasma, quanto eventos celulares.

A importância dos alelos E4, alelo de risco, e E2, alelo protetor, têm sido abordados na literatura como fatores importantes para o metabolismo de lípidos (ILVESKOSKI e col. 2000). O estudo do genótipo da apo E, nos pacientes estudados, não demonstrou correlacionar-se com qualquer das variáveis observadas, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes estudados (WAGNER, 1998).

Os achados deste estudo validam o método de captação da emulsão artificial (LDE). O fato da LDE ser captada pela parede arterial pode ser de grande importância, devido às possibilidades diagnósticas e terapêuticas advindas de sua utilização.

CONCLUSÕES

9 CONCLUSÕES

1. A velocidade de remoção plasmática do CL-³H e do CE-¹⁴C foi semelhante, demonstrando que o fenômeno de captação, confirmado pela recuperação de radioatividade nos fragmentos vasculares e no pericárdio, aparentemente, independe da velocidade de remoção plasmática da LDE.
2. A captação do colesterol triciado foi maior na aorta quando comparada aos fragmentos de artéria torácica interna, veia safena e pericárdio.
3. A esterificação do CL-³H diferiu entre os fragmentos de artéria, veia e pericárdio, sendo que, a taxa de esterificação foi maior nas artérias aorta e torácica interna quando comparada à veia safena.
4. O número de indivíduos estudados não foi suficiente para suportar as evidências obtidas da análise de correlação, ou seja, não houve correlação linear entre as variáveis estudadas, indicando a necessidade de aumentar o número de pacientes para realizar análise de correlação.
5. Os valores obtidos da captação tecidual de ambos os marcadores da LDE mostraram-se satisfatórios em ordem de grandeza e reprodutibilidade, validando a metodologia de estudo.

ANEXOS

10 ANEXO A

Quadro 1 – Tampão A utilizado para realizar hemólise do sangue total

Tampão A
1 mM de NH_4HCO_3
144 mM NH_4Cl

Quadro 2 – Tampão B etapa de lise

Tampão B
10 mM Tris-HCl pH 8.0
400 mM NaCl
2 mM Na_2EDTA 0,5 M pH 8,0

Quadro 3 – Tampão C etapa de lise (digestão).

Tampão C
50 μ L de SDS 10%
2 μ L de Na ₂ EDTA 0,5 M pH 8,0
0,488 mL de água destilada.

Quadro 4 – Tampão para dissolver o DNA.

TE 1X*
10 mM Tris-HCl pH 8,0;
1 mM EDTA pH 8,0.

(*) O volume de TE vai depender do tamanho do sedimento (pellet) de DNA, deixar o DNA dissolver por 48 h a 4°C.

10.1 ANEXO B

TABELA A – Taxa fracional de remoção da LDE nos pacientes submetidos a revascularização miocárdica.

LDE	TFR h ⁻¹	Valor de p
CL- ³ H	0,05275 ± 0,0123	0,5635
CE- ¹⁴ C	0,0617 ± 0,0087	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, J.; PASTERNAK, R.C. Changing the natural history of coronary artery disease. **Cardiol Clin**, v.14, p.1-17, 1996.

ASSMANN, G.; FUNKE, H.; SCHMITZ, G. Low-density lipoproteins and hypercholesterolemia. **Drug Research**, v. 39, p. 996, 1989.

BERCEDO-SANZ, A. Impact of Apo E allele on total cholesterol levels of children in northern Spain. **Clin Genet**, V.55, p. 69-70, 1999.

BEVINGTON, P.R. **Data reduction and error analysis for the physical sciences**. Mc Graw Hill, New York. 1969.

BISHOP, M.L., DUBEN-ENGELKIRK, J.L., FODY, E.P., **Clinical chemistry – principles, procedures, correlations**. 4th edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 682 p.

BRECHER, P.I., CHOBANIAN, A.V. Cholesterol ester synthesis in normal and atherosclerotic aortas of rabbits and rhesus monkeys. **Circ Res**, v.35, p. 692-700, 1974.

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

BROWN, W.V. Atherosclerosis: risk factors and treatment, In: Braunwald E, ed. **Essencial Atlas of Heart Diseases**. Philadelphia: Current Medicine. v.1, p.1.38, 1997.

BURNSTEIN, M., SCOLNICK, H. R., MORFIN, R. Rapid methods for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. **J Lipid Res**, v. 11,p. 583-595, 1970.

CARPENTIER, Y.A., SIMOES, C., SIDEROVA, V., NAKADI, I.E.,
VANWEYENBERG, V.,EGGERICKX, D., DECKELBAUM, R.J. Recent developments in lipid emulsions: Relevance to intensive care. **Nutrition**, V.13, p. 73-78, 1997.

CHAIT, A., HENZE, K., MAZZONE, T., JENSEN, M., HAMMOND, W. Low density lipoprotein receptor activity in fresh isolated human blood monocytes and lymphocytes. **Metabolism**, v. 31, p. 721- 727, 1982.

CNOP, M., GRUPPING, A., HOORENS, A., BOUWENS, L., PIPELEERS-MARICHAL, M., PIPELEERS, D. Endocytosis of low-density lipoprotein by human pancreatic β cells and uptake in lipide-storing vasicles, which increase with age. **Am J Pathol**, V.156, p. 237-243, 2000.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Pathologic Basis of Disease**. 6.ed. Philadelphia, Saunders, 1999. 1425p.

DAVIGNON, J., GREGG, R.E., SING, C.F. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, V.8, p. 1-21, 1988.

DRAPER, N.R., SMITH, H. **In applied regression analysis**. John Wiley & Sons, Inc., New York. 1966.

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**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FREEDMAN, D.S., OTNOS J.D., JEYARAJAH E.J., BARBORIAK, J.J., ANDERSON, A.J., WALKER, J.A. Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.12, p.1046-1053, 1998.

- FRIEDWALD, W. T., LEVY, R. I., FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-502, 1972.
- GALLAGHER, P.M., MELEADY, R., SHIELDS, D.C., TAN, K.S., MCMASTER, D., ROZEN, R., EVANS, A., GRANHAM, I.M., WHITEHEAD, A.S.
Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation. **Circulation**, V.94, p. 2154-2158, 1996.
- GALTON, D.J. Genetic determinants of atherosclerosis-related dyslipidemias and their clinical implications. **Clin Chim Acta**, v.257, p. 181-197, 1997.
- GINSBURG, G. S., SMALL, D. M., ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein. **J Biol Chem**, v. 257, P. 8216-8227, 1982.
- GINSBURG, G.S.; SMALL, D.M.; ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low-density lipoprotein. **J Biol Chem**, v.257, p.8216-8227, 1982.
- GOLDSTEIN, J.L.; ANDERSON, R.G.W.; BROWN, M.S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. **Nature**, v. 279, p. 679-685, 1979.

GRAHAM, I.M., DALY, L.E., REFSUM, H.M. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. **JAMA**, V.277, p. 1775-1781, 1997.

GRAZIANE, S. **Uso de uma Microemulsão Lipídica como Veículo de Quimioterápicos no Tratamento do Câncer de Mama Metastático**. São Paulo, 1999. 85p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

GRUNDY, S.M.; Hipertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. **Am J Cardiol**, v.81.(4A), p.18-25, 1998.

HIXSON, J.E.; VERNIER, D.T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. **J Lipid Res**, v.31, p.545-548, 1990.

HO, Y. K., SMITH, R. G., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. **Blood**, v. 52, p. 1099-1114, 1978.

HOWARD, B.V. Insulin resistance and lipid metabolism. **Am J Cardiol**, v.84, p.28-32, 1999.

HUNT, B.J. The endothelium in atherogenesis. **Lupus**, v.9, p.189-193, 2000.

IKEDA, U.; OGUCHI, A.; OKADA, K.; ISHIKAWA, S.; SAITO, T.; IKEDA, M.;
 KANO, S.; TAKAHASHI, M.; SHIOMI, M.; SHIMADA, K.; Involvement of LDL
 Receptor in Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells.
Atherosclerosis, v.110, p. 87-94, 1994.

ILVESKOSKI, E.; e col. Apolipoprotein E polymorphism and carotid artery
 intima-media thickness in a random sample of middle-aged men.
Atherosclerosis, v.153.p.147-153, 2000.

KANG, S.S., WONG, P.W.K., SUSMANO, A., SORA, H., NORUSIS, M.,
 RUGIE, N. Thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase: an inherited
 risk factor for coronary artery disease. **Am J Hum Genet**, V.48, p. 536-545,
 1991.

KARPE, F.; TASKINEN, M.R.; NIEMINEN, M.S.; FRICK, M.H.; KESANIEMI,
 Y.A.; PASTERNAK, A.; HAMSTEN, A.; SYVANNE, M. Remnant-like
 lipoprotein particle cholesterol concentration and progression of coronary
 and vein-graft atherosclerosis in response to genfibrozil treatment.
Atherosclerosis, v.157, p.181-187, 2001.

KATAOKA, H.; KUME, N.; MIYAMOTO, S.; MINAMI, M.; MORIWAKI, H.;
 MURASE, T.; SAWAMURA, T.; MASAKI, T.; HASHIMOTO, N.; KITA, T.;
 Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human
 atherosclerotic lesions. **Circulation**, v. 99, p.3110-3117, 1999.

KEYS, A. Coronary heart disease in seven countries. **Circulation**, v. 41 (suppl I): 1, 1970.

KLUIJTMANS, L.A.J., VAN DEN HEUVEL, L.P.W.J., BOERS, G.H.J., FROSST, P., STEVENS, E.M.B., VAN OOST, B.A., DEN HEIJER, M., TRIJBELS, F.J.M., ROZEN, R., BLOM, H.J. Molecular genetics analysis in mild hyperhomocysteinaemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. **Am J Hum Genet**, V.58, p. 35-41, 1996.

KRAUSS, R.M. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. **Am J Cardiol**, v.81(4A), p.13-17, 1998.

KREISBERG, R.A. Diabetic dyslipidemia. **Am J Cardiol**, v.82, p.67-73, 1998.

KWITEROVICH, P.O. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: A current review. **Am J Cardiol**, v.86s, p.5-10, 2000.

LESTAVEL-DELATTRE, S.; MARTIN-NIZARD, F.; CLAVEY, V.; TESTARD, P.; FAVRE, G.; DOUALIN, G.; HOUSSAINI, H.S.; BARD, J.M.; DURIEZ, P.; DELBART, C.; SOULA, G.; LESIEUR D. e col. Low-density lipoprotein for delivery of na acrylophenone antineoplastic molecule into malignant cells. **Cancer Res**, v.52, p.3629-3635, 1992.

LIAO, J.K.; Endothelium and acute coronary syndromes. **Clin Chem**, v.44(8), p. 1799-1808, 1998.

LIBBY, P. Inflammatory and immune mechanisms in atherogenesis. In: Leaf A, Weber P, eds. **Atherosclerosis reviews**, New York: Raven Press, 1990. p.70-89.

LIBBY, P.; HANSSON, G.K. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. **Lab Invest**, p.64-65, 1991.

LLORENTE-CORTÉS, V., MARTINEZ-GONZALEZ, J., BADIMON, L. LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, p. 1572-1579, 2000.

MAHLEY, R.W. Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor – related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. **Isr J Med Sci**, v.32, p.414-429, 1996.

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

MARANHÃO, R. C., GARICOCHEA, B., SILVA, E. L., E COL. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low density lipoprotein in patients with acute leukemia. **Cancer Res**, v. 54, p. 4660-4666, 1994.

MARANHÃO, R. C., TERCYAK, A. M., REDGRAVE, T. G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein free emulsion models of lipoproteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 875, p. 247-255, 1986.

MARANHÃO, R.C., FERES, M.C.; MARTINS, M.T.; MESQUITA, C.H., TOFFOLETTO, O.; VINAGRE, C.G.C.; GIANINNI, S.D.; PILEGGI, F. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.126, p.15-25, 1996.

MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; DORLHIAC-LLACER, P.; CADENA, S.M.S.; COELHO, I.J.C.; MENEGHETTI, J.C.; PILEGGI, F.J.C.; CHAMONE, A.F. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. **Cancer Res**, v.54, p.4660-4666, 1994.

MARANHÃO, R.C; FERES, M.C.; MARTINS, M.T.; MESQUITA, C.H., TOFFOLETTO, O.; VINAGRE, C.G.C.; GIANINNI, S.D.; PILEGGI, F Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to LDL receptors. **Lipids**, v.32, p. 627-33, 1997.

MARQUINA, S.M., KOSCHINSKY, M.L. Lipoprotein (a) as a risk factor for coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v.82s, p.57-66, 1998.

MATTHEWS, C.M.E. The theory of tracer experiments with I labelled plasma proteins. **Phys Med Biol**, v.2, p. 36-42, 1957.

MCKULLY, K.S. Vascular pathology of homocysteinaemia: Implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am J Pathol**, V.56, p. 111-128, 1969.

MENDALL, M.A.; GOGGIN, P.; MOLINEAUX, N.; LEVY, J.; TOOSY, T.; STRACHAN, D.P.; NORTHFIELD, T.C. Association between childhood living conditions and Helicobacter seropositivity in adult life. **Lancet**, v.1, p.896-897, 1992.

MESQUITA, C.H. - **Análise compartimental auxiliar**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), [Publicações IPEN]; 1994.

MILLER, K. W., SMALL, D. M. Surface to core and interparticle equilibrium distribution of triglyceride-rich lipoprotein lipids. **J Biol Chem**, v. 258,P. 13772-13784, 1983a.

MILLER, K. W., SMALL, D. M. Triolein-cholesteryl oleate-cholesterol-lecithin emulsions, structural models of triglyceride-rich lipoproteins. **Biochemistry**, v. 22, p. 443-451, 1983b.

MOTTI, C., GNASSO, A., BERNARDINE, S., MASSOUD, R., PASTORE, A., RAMPA, P., FEDERICI, G., CORTESE, C. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine and other risk factors for vascular disease. **Atherosclerosis**, v.139, p. 377-383, 1998.

MOTULSKY A.G. Nutritional ecogenetics: Homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. **Am J Hum Genet**, V.58, p. 17-20, 1996.

MUDD, S.H., LEVY, HZ., SKOUBY, F. Disorders of transsulphuration, vol.1. In: Scriver C.R., Beaudet, A., Sly W.S., Valle, D. Eds. **The metabolic and molecular basis of inherited disease**. New York: McGraw-Hill, p. 1279-1327, 1995.

NYGARD, O., NORDREHAUG, J.E., REFSUM, H., UELAND, P.M., FARSTAD, M., VOLLSET, S.E. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. **N Engl J Med**, V.337, p. 230-236, 1997.

PATSCH, JR., MIESENBOCK, G., HOPFERWIESER, T., MUHLBERGER, V., KNAPP, E., DUNN, J.K., GOTTO, A.M.JR., PATSCH, W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.12, p.1336-1345, 1992.

RICCIARELLI, R., ZINGG, J-M., AZZI, A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD 36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. **Circulation**, V.102, p. 82-87, 2000.

ROLAND, I. **Metabolismo de emulsões semelhantes a fase lipídica da LDL em indivíduos normais e hiperlipidêmicos**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1992.

SALAZAR, L.A., HIRATA, M.H., GIANNINI, S.D., FORTI, N., DIAMENT J., LIMA, T.M., HIRATA, R.D.C. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. **Clin Chim Acta**, V.300, p. 139-149, 2000.

SANTOS FILHO, R.D. **Efeitos da sinvastatina no perfil lipídico e na remoção plasmática de uma emulsão lipídica semelhante à lipoproteína de baixa densidade (LDL)**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1995.

SIEDEL, J., SCHULUMBERGER, H., KLOSE, S., ZIEGENHORN, J., WAHLFELD, A. W. Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol. **J Clin Chem**, v. 19, p. 838-839, 1981.

SILVA, E. L.; Yi, H.C.; MORIEL, P.; MIARA, J.; BARBOSA, D.S.; ARAÚJO, F.B.;
 ABDALLA, D.S.P. Lipoprotein oxidation: implications to atherogenesis. **J
 Braz Assoc Adv Sci**, v.47, p.376-384, 1995.

STEMME, S.; FABER, B.; HOLM, J.; WIKLUND, O.; WITZTUM, J.L.;
 HANSSON, G.K. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques
 recognize oxidized low density lipoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.92,
 p.3893, 1995.

THAMBYRAJAH, J., TOWNEND, J.N. Homocysteine and atherothrombosis –
 mechanisms for injury. **Eur Heart J**, V.21, p. 967-974, 2000.

TIRET, L., DE KNIJFF, P., MENZEL, H.J., EHNHOLM, C., NICAUD, V.,
 HAVEKES, L.M. Apo E polymorphism and predisposition to coronary artery
 disease in youths of different European populations. The EARS study.
Arterioscler Thromb Vasc Biol, V.14, p. 1617-1624, 1994.

UTERMANN, G., HEES, M., STEINMETZ, A. Polymorphism of apolipoprotein E
 and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. **Nature**, v.269, p. 604-
 607, 1977.

VITOLS, S. Uptake of low-density lipoprotein by malignant cells-possible
 therapeutic applications. **Cancer Cells**, v.3(12), p. 488-494, 1991.

WAGNER, M.B. Significância com confiança?. **J Pediatr**, v.74(4), p.343-346, 1998.

WELCH, G.N. Homocysteine and atherothrombosis. **N Engl J Med**, v.338 (15), p.1042-1048, 1998.

WITZTUM, J.L. Immunological response to oxidized LDL. **Atherosclerosis**, s.131, p.9-11, 1997.

YLÄ-HERTTUALA, S; LUOMA, J; KALLIONPPAA, H.; Laukkanen, M;
LEHTOLAINEN, P.; Viita, H. Pathogenesis of atherosclerosis. **Maturitas**, s.23, p.47-49, 1996.